



TITLE:

サルの β -Melanocyte-stimulating Hormoneの全合成研究(Dissertation_全文)

AUTHOR(S):

岡田, 芳男

CITATION:

岡田, 芳男. サルの β -Melanocyte-stimulating Hormoneの全合成研究. 京都大学, 1969, 薬学博士

ISSUE DATE:

1969-01-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k862>

RIGHT:

主論文

サル の β -Melanocyte-Stimulating Hormone の

全合成研究

岡田芳男

サル の β -Melanocyte-Stimulating Hormone の

全 合 成 研 究

岡 田 芳 男

サルの β -Melanocyte-Stimulating Hormoneの 全合成研究

目 次

理論の部	
緒言	1
第一章 MSHに関する従来の研究概要	3
第一節 MSHの構造と生理作用	3
〔1.1.1〕 α -, β -MSHの構造	3
〔1.1.2〕 MSH活性の測定	5
〔1.1.3〕 MSHの示す種々の生理作用 (MSH外作用)	5
第二節 β -MSHに関する従来までの合成研究概要	6
第二章 サルの β -MSH合成の原理	9
第一節 保護基の選択	9
第二節 結合様式の検討	13
第三章 H-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys (CHO) -Asp-OH (9~18) および関連ペプチドの合成	18
第一節 H-Ser-Pro-Pro-Lys (CHO) -Asp-OH (14~18) の合成	18
〔3.1.1〕 Z-Ser-Pro-Pro-Lys (CHO) -Asp (OMe) ₂ よりペプチド (14~18) 合成の試み	18
〔3.1.2〕 H-Ser-Pro-Pro-Lys (CHO) -Asp-OH (14~18) の合成	20
第二節 H-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys (CHO) -Asp-OH (9~18) の合成	22
第三節 脱ホルミル化反応の検討と H-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys-Asp-OH (9~18) の合成	26

第四節	関連ペプチド, H-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-OH (10~16) の合成	29
第四章	H-Pro-Tyr-Arg-Met-OH (4~7) の合成	32
第一節	H-Arg-Met-OH (6~7) の合成	32
第二節	H-Pro-Tyr-Arg-Met-OH (4~7) の合成	36
第五章	H-Pro-Tyr-Arg-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys (CHO) -Asp-OH (4~18) の合成	38
第一節	H-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys (CHO) -Asp-OH (8~18) の合成	38
第二節	H-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys (CHO) -Asp-OH (7~18) の合成	41
第三節	H-Arg-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys (CHO) -Asp-OH (6~18) の合成	42
第四節	H-Pro-Tyr-Arg-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys (CHO) -Asp-OH (4~18) の合成	46
第六章	サルの β -Melanocyte-Stimulating Hormone (β -MSH) の全合成と合成ペプチドの MSH 活性	50
第一節	Boc-Asp (OBu ^t) -Glu (OBu ^t) -Gly-OH (1~3) の合成	50
第二節	サルの β -MSH の全合成	52
第三節	合成ペプチドの MSH 活性	61
結 語		63
謝 辞		63
実験の部		65
[I]	第三章に関する実験、H-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys (CHO) -Asp-OH および関連ペプチドの合成	66
[I-A]	Z-Ser-Pro-Pro-Lys (CHO) -Asp (OMe) ₂ の合成	66

i)	Z-Lys (CHO) -Asp (OMe) ₂	6 6
ii)	H-Lys (CHO) -Asp (OMe) ₂	6 6
iii)	H-Lys (CHO) -Asp (OMe) ₂ のジケトピペラジン	6 7
iv)	Z-Pro-Lys (CHO) -Asp (OMe) ₂	6 7
v)	H-Pro-Lys (CHO) -Asp (OMe) ₂	6 7
vi)	Z-Ser-Pro-OH	6 3
vii)	Z-Ser-Pro-Pro-Lys (CHO) -Asp (OMe) ₂	6 3
viii)	Z-Ser-Pro-Pro-Lys (CHO) -Asp (OMe) ₂ の酸 , アルカリ処理	6 3
[I-B]	H-Ser-Pro-Pro-Lys (CHO) -Asp-OH の合成	6 9
i)	Z-Lys (CHO) -Asp-OH	6 9
ii)	H-Lys (CHO) -Asp-OH	6 9
iii)	Z-Pro-Lys (CHO) -Asp-OH	6 9
iv)	H-Pro-Lys (CHO) -Asp-OH	7 0
v)	Z-Pro-Pro-Lys (CHO) -Asp-OH	7 1
vi)	H-Pro-Pro-Lys (CHO) -Asp-OH	7 1
vii)	Z-Ser-Pro-OMe	7 2
viii)	Z-Ser-Pro-NHNH ₂	7 2
ix)	Z-Ser-Pro-Pro-Lys (CHO) -Asp-OH	7 2
x)	H-Ser-Pro-Pro-Lys (CHO) -Asp-OH	7 4
[I-C]	H-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys (CHO) -Asp-OH	7 4
[I-D]	脱ホルミル化反応	7 5
i)	N ^ε -formyllysine の脱ホルミル化反応	7 5
ii)	H-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys-Asp-OH	7 6
[I-E]	H-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-OH の合成	7 6
i)	Z-Ser-Pro-Pro-OBzl	7 6
ii)	H-Ser-Pro-Pro-OH	7 7

iii)	H-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-OH.....	77
iv)	Ac-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-OH	78
[II]	第四章に関する実験 , H-Pro-Tyr-Arg-Met-OH の合成	79
i)	Z-Arg (Tos) -Met-OMe	79
ii)	Z-Arg (Tos) -Met-OH	79
iii)	Z-Arg (NO ₂) -Met-OMe	79
iv)	Z-Arg (NO ₂) -Met-OH	80
v)	Boc-Arg (NO ₂) -Met-OH	80
vi)	H-Arg-Met-OH.....	80
a)	液安ナトリウム法	80
b)	弗化水素法	81
c)	塩化第一錫法	81
vii)	Z-Arg (NO ₂) -Met-OH の液安ナトリウム処理	81
viii)	Boc-Pro-Tyr-OMe.....	82
ix)	Boc-Pro-Tyr-NHNH ₂	82
x)	H-Pro-Tyr-Arg-Met-OH	82
xi)	N ^ε -formyllysine の弗化水素処理	83
xli)	N ^ε -formyllysine のトリフルオロ酢酸処理	83
[III]	第五章に関する実験 , H-Pro-Tyr-Arg-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys (CHO)-Asp-OH の合成	84
i)	H-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys (CHO) -Asp-OH.....	84
ii)	H-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys (CHO) -Asp-OH	85
iii)	H-Arg-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys (CHO) -Asp-OH	85

iv)	H-Pro-Tyr-Arg-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys (CHO)-Asp-OH	87
[IV]	第六章に関する実験, サルの β -MSHの全合成	89
i)	Z-Glu (OBu ^t)-Gly-OMe	89
ii)	Z-Glu (OBu ^t)-Gly-OH	89
iii)	H-Glu (OBu ^t)-Gly-OH	90
iv)	Z-Asp (OBu ^t)-Glu (OBu ^t)-Gly-OH	90
v)	H-Asp (OBu ^t)-Glu (OBu ^t)-Gly-OH	91
vi)	H-Asp-Glu-Gly-OH	91
vii)	Boc-Asp (OBu ^t)-Glu (OBu ^t)-Gly-OH	92
viii)	Boc-Asp (OBu ^t)-Glu (OBu ^t)-Gly-OMe と ヒ ド ラ ジ ン との反応	92
ix)	H-Asp-Glu-Gly-Pro-Tyr-Arg-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys (CHO)-Asp-OH	93
x)	H-Asp-Glu-Gly-Pro-Tyr-Arg-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys-Asp-OH	94
	引用文献	96

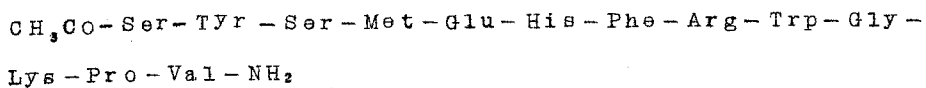
緒

言

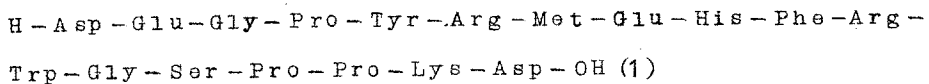
Melanocyte-Stimulating Hormone (メラニン細胞刺激ホルモン) は動物の脳下垂体から分泌され、メラニン細胞に作用して皮膚を黒化せしめるペプチドホルモンである。

1961年、Lee等¹⁾はサルの脳下垂体より二種の Melanocyte-Stimulating Hormone (α -MSH および β -MSH (1)) を分離し、その構造を次のごとく決定した。

α -MSH



β -MSH



このうち α -MSHは他の動物、たとえば牛、馬、羊等のそれと構造上全く同じであり、その合成研究もなされている。一方サルの β -MSHの中には arginylmethionine という合成的に困難なアミノ酸配列が含まれており、その合成についての報告は見当らない。したがって本 β -MSHを合成することは脳下垂体の内分泌学のみならず、ペプチド合成化学の上からも興味ある事と考え、本研究を実施した。今回著者は以下に記すごとく、本サル β -MSH (1) の全合成に成功するとともに、その構造と MSH 活性度との関係を明らかにする事が出来た。

註 1

本論文に用いるアミノ酸、および保護基の略号を IUPAC-IUB の命名法に従って記す。

1) Amino acids

Arginine	Arg	Aspartic acid	Asp
Glutamic acid	Glu	Glycine	Gly
Histidine	His	Lysine	Lys
Methionine	Met	Ornithine	Orn
Phenylalanine	Phe	Proline	Pro
Serine	Ser	Tryptophan	Trp
Tyrosine	Tyr		

2) Amino-protecting groups

Benzyloxycarbonyl : Z, *t*-Butoxycarbonyl : Boc

3) Carboxyl-protecting groups

Methyl ester : -OMe, Benzyl ester : -OBzl,

t-Butyl ester : -OBu^t, *p*-Nitrophenyl ester : -ONp

4) Amino acid's derivatives

N^ε-formyllysine derivative : $\overset{\text{CHO}}{\underset{|}{\text{Lys}}}$ or -Lys(CHO)-

N^ε-nitroarginine derivative : $\overset{\text{NO}_2}{\underset{|}{\text{Arg}}}$ or -Arg(NO₂)- *

γ-benzylglutamate derivative : $\overset{\text{OBzl}}{\underset{|}{\text{Glu}}}$ or -Glu(OBzl)-

γ-*t*-butylglutamate derivative : $\overset{\text{OBu}^t}{\underset{|}{\text{Glu}}}$ or -Glu(OBu^t)-

β-*t*-butylaspartate derivative : $\overset{\text{OBu}^t}{\underset{|}{\text{Asp}}}$ or -Asp(OBu^t)-

* IUPAC-IUB命名法に記載されていないが本論文にはこれを採用した。

第一章 MSHに関する従来の研究概要

第一節 MSHの構造と生理作用

[1.1.1] α -, β -MSHの構造

1916年Smith²⁾およびAllen³⁾はそれぞれ独立に、カエルの脳下垂体を取り除くとその皮膚の色が漂白される事を観察したが、次いで1919年Atwell⁴⁾は哺乳動物の脳下垂体抽出物が、脳下垂体を摘出したオタマジャクシの皮膚の色を黒化せしめる事を見出し、ここに皮膚の黒化をつかさどる因子の存在が明らかになった。当初この作用物質は *intermedin*, *substance B*, *melanophore dilating principle*, *melanophore hormone* 等と呼ばれたが、1953年Fitzpatrick等⁵⁾, Gordon⁶⁾の提称により *melanocyte-stimulating hormone* (MSH) と呼ばれる様になった。

1955年Lee等⁷⁾は豚の脳下垂体より、MSH作用を有する等電点10.5~11の均一な物質を単離したが、一方Porath等⁸⁾およびBenfey等⁹⁾が同じく豚の脳下垂体より分離したMSH活性物質は、全く異なった等電点5.2を示すものであった。その後Lee等¹⁰⁾はこれらが分離操作中に相互変換したものでないことを示すとともに、前者を α -MSH、後者を β -MSHと呼んだ。すなわち、一つの動物、ブタの脳下垂体中に二種類のMSHが存在することが判明したわけである。

1956年に、Harris等¹¹⁾、およびGeschwind等¹²⁾によって豚の β -MSHの構造が決定され、翌1957年に、Harris等¹³⁾により豚の α -MSHの構造が決定された。現在、豚^{10,13,14)}、牛¹⁵⁾、馬¹⁶⁾、猿¹⁾から α -MSHが単離され、その構造が決定されているが、その構造は動物の種差にかかわらず同一である。

一方、 β -MSHは、豚¹¹⁾、牛¹⁷⁾、羊¹⁵⁾、馬¹⁸⁾、猿¹⁾、人¹⁹⁾から単離されたが、それらの構造は図1に示すごとく、動物の種類により少しづつ異なっていることが判明した。 α -MSHのアミノ酸配列は、同じく脳下垂体中に含まれる副腎皮質刺激ホルモン (ACTH)²⁰⁾のN末端から13番目までのアミノ酸配列と全く同じであり、ACTHもMSH作用を有している。これら三種のペプチドホルモン、 α -, β -MSHおよびACTHの構造を比較すると、これらはいずれも、分子中に $-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-$ という共通のアミノ酸配列を有しており、この配列の前後に一つずつ異なるアミノ酸をおいて、TyrとPro残基を有するのが特徴である。

α -MSH

ブタ、ウシ CH₃CO-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-
ウマ、サル Gly-Lys-Pro-Val-NH₂

β -MSH

ブタ Asp-Glu-Gly-Pro-Tyr-Lys-Met-Glu-His-Phe-Arg-
Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys-Asp
ウシ Asp-Ser-Gly-Pro-Tyr-Lys-Met-Glu-His-Phe-Arg-
ヒツジ Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys-Asp
ウマ Asp-Glu-Gly-Pro-Tyr-Lys-Met-Glu-His-Phe-Arg-
Trp-Gly-Ser-Pro-Arg-Lys-Asp
サル Asp-Glu-Gly-Pro-Tyr-Arg-Met-Glu-His-Phe-Arg-
Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys-Asp
ヒト Ala-Glu-Lys-Lys-Asp-Glu-Gly-Pro-Tyr-Arg-Met-
Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys-Asp

ブタのACTH

Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-
Pro-Val-Gly-Lys-Lys-Arg-Arg-Pro-Val-Lys-Val-
Tyr-Pro-Asp-Gly-Ala-Glu-Asp-Gln-Leu-Ala-Glu-
Ala-Phe-Pro-Leu-Glu-Phe

図1 α -MSH, β -MSH, ブタのACTHのアミノ酸配列

〔 1.1.2 〕 MSH活性の測定

MSHはメラニン細胞を刺激してメラニン顆粒を拡散させ、その結果皮膚の色を黒化せしめる。この作用機序については種々の説があるが、いまだ確定していないのが現状である。

このMSH活性度を測定するには主として、次の二つの方法が用いられている。その一つは、古くから行われて来た*in vivo*の方法で、脳下垂体を摘出した蛙のリンパ嚢に被検液を注射し、足指のミズカキにおけるメラニン顆粒の拡散する度合を測定する方法である。²¹⁾ この改良法として、Kastin等²²⁾ は大動脈幹に被検液を注射する方法が、より感度が良い事を報告している。

他の一つはShizume, Lerner等^{23, 24)} によって採用された*in vitro*の方法によるもので、スチール環に固定された蛙の大腿部および脛の皮膚に、20~25°Cで、リンゲル液中被検液を作用させ、60分後における皮膚の色の黒化の度合を光電反射計により測定する方法である。この方法は、*in vivo*の方法よりも感度が優れているため、現在ひろく採用されている。この際、Shizume, Lerner等²³⁾ はMSH活性度の基準として、ウシの脳下垂体後葉の粗抽出物0.04 γ が*in vitro*で示す黒化の度合を1MSH単位としたが、この基準のもとで、精製された α -MSHは 2×10^{10} MSHU/gの活性を有する事、 β -MSHは 10^9 レベルの、又ACTHは $10^7 \sim 10^8$ レベルのMSH活性を有する事が報告された。最近になって、高度に精製された α -MSHは 10^{12} レベルの、又ブタの β -MSHは 10^{11} レベルの活性を有すると報告されたが、²⁵⁾ これらは分離技術の進歩によるものと考えられる。

本研究において、著者の合成した種々のペプチドのMSH活性は、蛙 (*Rana pipiens*) を使用し、*in vitro*の方法^{23, 24)} で、アメリカ、Yale大学のSaul Lande博士のもとにおいて測定されたものである。

〔 1.1.3 〕 MSHの示す種々の生理作用 (MSH外作用)

最近、 α -、 β -MSHはメラニン細胞に対して作用する他に、種々の生理作用を示す事が次第に明らかとなって来た。これら作用のうちには、 α -、 β -MSHおよびACTHに共通のもの、あるいはそれぞれのホルモンに特有と思われるものもあり、内分泌学上興味深い問題である。

これら三つのホルモンに共通した生理作用について、Engel等²⁶⁾ は脂肪組織より脂肪酸を遊離せしめるlipolytic活性を報告しており、Ferrai等²⁷⁾ は、犬の大槽内にこれらホルモンを注射すると、伸展症状をひきおこす事を、又Bower等²⁸⁾ は、これらがネズミの甲

状線からヨードの遊離を促進する事を報告している。

Krayer 等²⁹⁾は、これら三者が *in vitro* において、心臓の搏動を昂進させる事を認めたが、この際 α -MSH, ACTH は β -MSH に較べその作用が強い事を述べている。又 Cehovic³⁰⁾ は、ブタの α -, β -MSH をネズミに注射すると、睪丸の重量が減少することを観察した。とくに、 β -MSH に関し、Krivoy 等³¹⁾ は、これをネコの静脈内に注射すると、脊髓中枢神経系に作用し、あくびを起させる事を報告し、本ペプチドと神経系との関連を示唆した。

以上のごとく、 α および β -MSH の示す種々の MSH 外作用が検討されている現状であり、このことは何故同じ動物の脳下垂体中に 2 種類の MSH が存在するのかという疑問点と密接な関連性があり、将来さらに検討されなければならない内分泌学上の問題である。

第二節 β -MSH に関する従来までの合成研究の概要

サルの脳下垂体中からも分離された α -MSH についての合成は、すでに Guttman 等³²⁾, Hofmann 等³³⁾, Schwyzzer 等³⁴⁾ の研究陣によってなされたが、これら合成研究によって解明された最も興味ある事は、MSH 活性は α -MSH 自体でなくても、その構造中のある区分によってすでに発現されるという事実であった。現在、MSH 活性を示す最小のペプチドは H-His-Phe-Arg-Trp-OH (3.6×10^4) と判断され³⁵⁾、このうち特に、His と Trp が活性の発現に重要と考えられている。この区分は、サルの β -MSH の構造にも含まれる共通の区分である。しかし、これら区分ペプチドの MSH 活性は天然品に較べてきわめて低く、ペプチド鎖の延長につれて活性も増大するわけであるが、その機構は後記する β -MSH 関連ペプチドを含めて未だ明らかでない。

β -MSH に関しては、ただ一例 Schwyzzer の研究陣が、ウシの β -MSH (Asp-Ser-Gly-Pro-Tyr-Lys-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys-Asp) の合成研究について報告しているのみである。

1959 年、Schwyzzer 等³⁶⁾ は、 α -アミノ基の保護に benzyloxycarbonyl(Bz), 6, 17 位 Lys の ϵ -アミノ基の保護に tosyl (Tos) を採用し、C 端 Asp をジメチルエステルとし、又 1 位 Asp, 8 位 Glu の代りにそれぞれ asparagine, glutamine を用いて合成を進め、最終段階に於て、水酸化バリウムによるエステルの鹼化、続いて液体アンモニア中カルシウムによる還元によって残った保護基の除去を試みたが、分子中のペプチド鎖の

転位および開裂を伴い、本品の合成は不成功に終わった。

以上の事実はウシの β -MSH中にアルカリに不安定な構造が含まれる事を示唆しており、後、1963年、Schwyzer等³⁷⁾は酸性条件下で除去出来る保護基、すなわちtrityl基 (Tri), *t*-butoxycarbonyl基 (Boc), *t*-butyl esterを採用して図2に示すごとくウシの β -MSHを合成した。

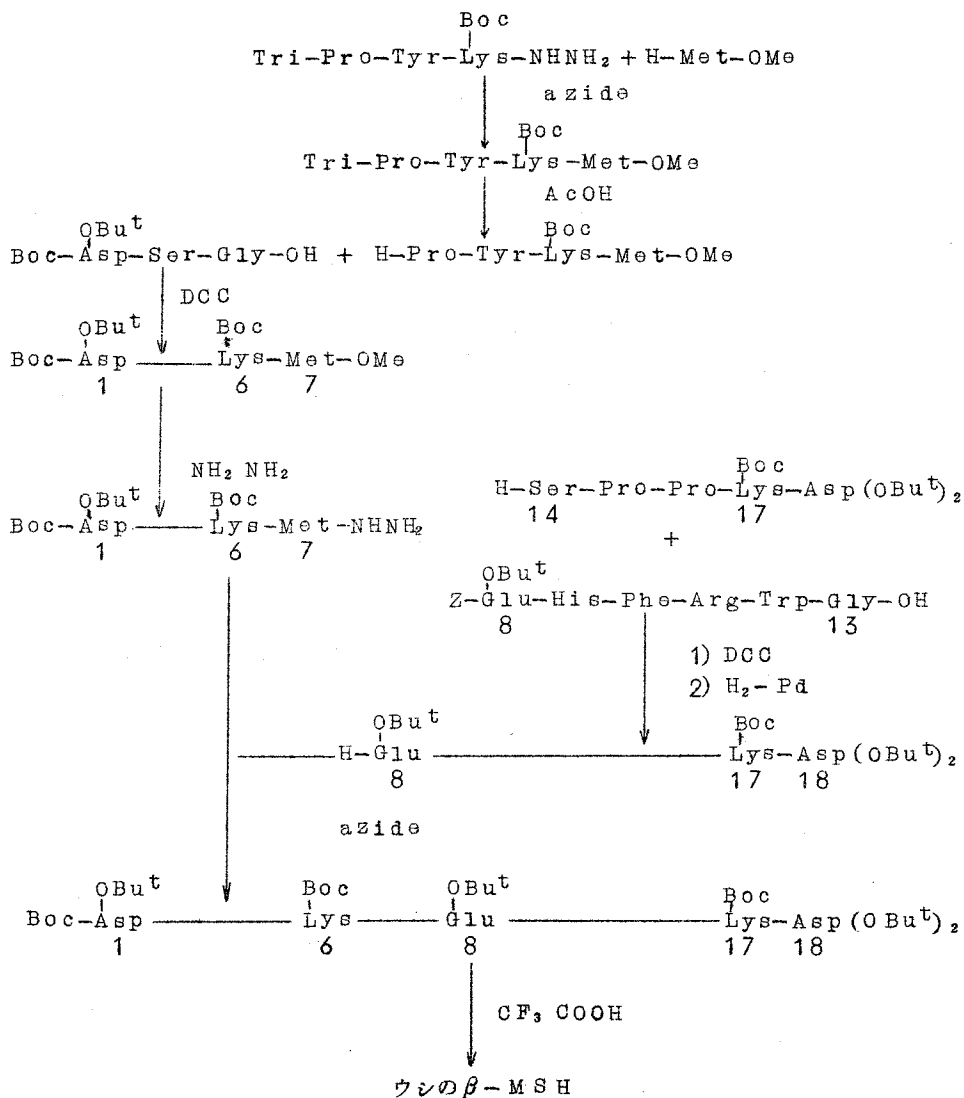


図2 Schwyzer 等によるウシの β -MSHの合成図

彼等は合成最終段階で (1~7) と (8~18) をアチド法で縮合させ、保護された octa-decapeptide を得ているが、この際使用された N 端 heptapeptide hydrazide, Boc-Asp (OBu^t) -Ser-Gly-Pro-Tyr-Lys (Boc) -Met-NHNH₂ の合成に疑問がないわけではない。何故ならば、対応のメチルエステルにヒドラジンを作用させた際、分子中の Asp の β -t-butyl ester は副反応を伴う事を Schwyzer 等自身指摘しており³⁷⁾、さらに最近になって、この種の副反応についての報告がある³⁸⁾。又 Schwyzer 等は、合成中間体をすべて交流分配法によって精製したが、これは量的な制限をうける合成法といわねばならない。なお、生理活性ペプチドの合成について重要な問題であるその構造と活性の関係についての検討は、表 1 に示すように、わずかしかなされなかった。

著者の合成したサルの β -MSH は、ウシの β -MSH の 2 位 Ser のかわりに Glu、6 位 Lys のかわりに Arg を有している。この差は僅かであるが、後記するようにペプチド合成上からは、Schwyzer 等の合成法³⁷⁾ をそのまま採用する事が出来ず、独自の合成法を採用したのである。

Schwyzzer 等の合成ペプチド	MSHU/g
$\begin{array}{ccccccc} \text{NH}_2 & & \text{Tos} & & \text{NH}_2 & & \\ & & & & & & \\ \text{Z-Asp-Ser-Gly-Pro-Tyr-Lys-Met-Glu-His-Phe-Arg-} \end{array}$	1.4×10^7
$\begin{array}{ccccccc} & & \text{Tos} & & & & \\ & & & & & & \\ \text{Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys-Asp(OMe)}_2 \end{array}$	
$\begin{array}{ccccccc} \text{NH}_2 & & & & \text{Tos} & & \\ & & & & & & \\ \text{H-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys-Asp(OMe)}_2 \end{array}$	8.4×10^4
$\begin{array}{ccccccc} \text{NH}_2 & & & & \text{Tos} & & \\ & & & & & & \\ \text{Z-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys-Asp(OMe)}_2 \end{array}$	6.4×10^4

表 1 Schwyzer 等によって合成されたウシの β -MSH 関連ペプチドとそれらの MSH 活性³⁶⁾

第二章 サルの β -MSH合成の原理

ペプチド合成において考慮しなければならない大切な問題は、ペプチド中の官能基に対する保護基の選択と、ペプチド区分の結合様式である。

前章に記したように、ウシの β -MSHの第6位、第17位は共に Lys であるため、Schwyzer等³⁷⁾はこれらに同じ保護基、すなわち *t*-butoxycarbonyl (Boc) 基を採用して合成を進めることが出来たが、サルの β -MSHは第6位が Arg であるため、彼等と同様の原理で合成を進めることが出来ない。さらに彼等にならって、サルの β -MSHのN端部 heptapeptide ester を合成しても、これを対応するhydrazideに導くことは好ましくない。何故なら、前記した Aspの問題だけではなく、ヒドラジンの塩基性のため Arg のグアニド基の脱離が生じ、^{39, 40)} その結果、ArgはOrn に転換し、目的物を純粋に得る事は不可能であるからである。(図3参照)

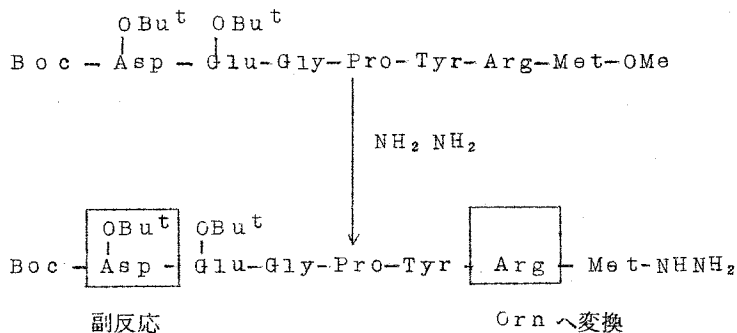
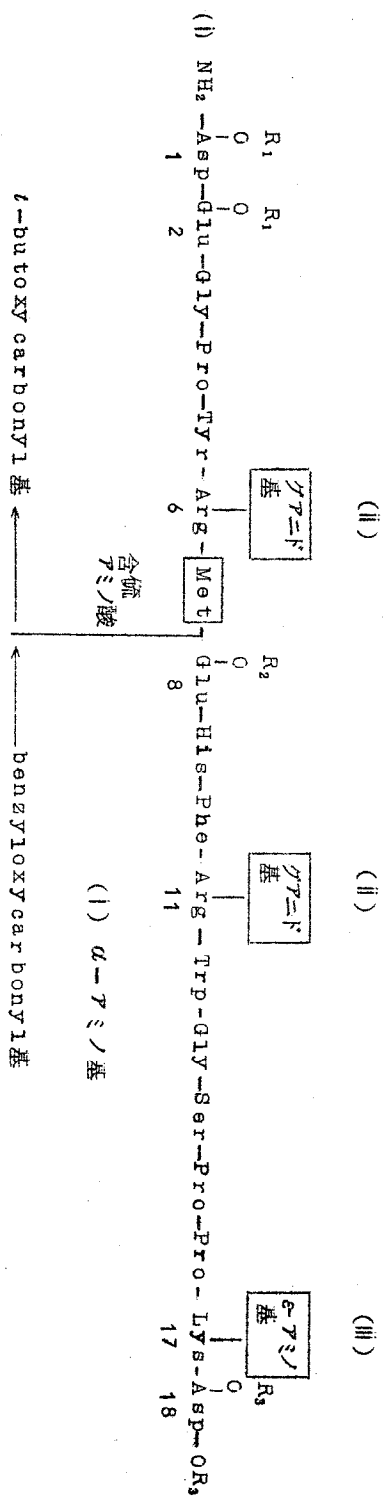


図3 N端 heptapeptide ester に対するヒドラジンの作用

そこで著者は独自にサルの β -MSHの合成法に検討を加えた。

第一節 保護基の選択

まず、サルの β -MSHを合成するにあたり、必要な構成アミノ酸官能基に対する保護基の選択について記す。主として考慮の対称となる官能基は、図4に示すように、1) α -アミノ基、および塩基性アミノ酸側鎖官能基、2) AspおよびGluのもつ酸性官能基に大別される。



保 護 基		除 去 方 法	
塩 基 性 残 基	(Ⅰ)	benzyloxycarbonyl (Z) 基 t-butoxycarbonyl (Boc) 基	H ₂ -Pd CF ₃ COOH
	(Ⅱ)	Nitro (-NO ₂) 基	11 : H ₂ -Pd, 6 : HF
	(Ⅲ)	Formyl (-CHO) 基	10% ヒドラジン酢酸
酸 性 残 基	Asp	1 位 t-Butyl ester R ₁ 18位 Dimethyl ester R ₃	CF ₃ COOH NaOH (alpeptideで除去)
	Glu	2 位 t-Butyl ester R ₁ 8 位 Benzyl ester R ₂	CF ₃ COOH H ₂ -Pd

図 4 保護基の選択

1) 塩基性官能基に対する保護基の選択

図4に示すように、合成にはⅠ) α -アミノ基、Ⅱ) 6位、11位 Arg のグアニド基、Ⅲ) 17位 Lys の ϵ -アミノ基、に必要な保護基として、原理的に少なくとも3つの異った保護基を選択しなければならない。9位 His のイミダゾール基については後記する。

Ⅰ) α -アミノ基の保護基

ペプチド形成反応、すなわち酸アミド形成反応に際して、酸成分アミノ酸の α -アミノ基は、適当な保護基で保護されていなければならない。そしてペプチド合成後、この保護基の除去によって遊離にされたアミノ基が、次のペプチド形成反応にあずかり、この様にしてペプチド鎖が延長される。

本分子中には、7位に Met が存在するが、C末端部よりの undecapeptide (8~18) の段階までは、ペプチド合成においてもっとも一般的な、接触還元で除去出来る、benzyloxycarbonyl (Z) 基を α -アミノ基の保護基として合成を進めるのが常法である。しかしながら、Met の導入後は、もはや接触還元が出来ないため、トリフルオロ酢酸か、稀酸で除去出来る *t*-butoxycarbonyl (Boc) 基を使用するのが好ましいと判断される。したがって、 α -アミノ基の保護基としては、図4に示すように、2種類の保護基が必要となった。

Ⅱ) Arg のグアニド基の保護基

現在、グアニド基の保護基として一般に使用されているのは、接触還元によって除去出来るニトロ基である。したがって11位 Arg の導入には、 N^G -nitroarginine を利用して合成を進めることが可能である。この導入後接触還元して得られる Arg の入ったペプチドは、それがアミノ成分として使用されるかぎり、又そのグアニド基が塩酸等によってプロトン化されているかぎり、副反応を伴うことなく次のペプチド合成に使用することが出来る。

問題となるのは6位 Arg の導入であって、この際 N^G -nitroarginine を使用すれば、Met の存在のためこのニトロ基を接触還元で除去することは出来ない。

緒言にふれたように、Arg-Met という組合せは、ペプチド合成上非常に困難な問題である。このため著者は、 N^{α} , N^G -di-*t*-butoxycarbonylarginine⁴¹⁾の利用を考慮したが、合成途上榎原等⁴²⁾は、弗化水素がニトロアルギニンのニトロ基を除去する事を報告するに至ったので、この方法を採用する事にした。これに関しては第四章第一節にくわしく記す。

III) Lysの ϵ -アミノ基の保護基

最後に問題となるのは17位 Lysの ϵ -アミノ基の保護基についてである。本アミノ基は合成の最終段階まで保護されていなければならない。換言すれば、合成中に採用する保護基が除去される条件下になお安定でなければならない。即ち接触還元、トリフルオロ酢酸、弗化水素等の作用で除去されないものでなくてはならない。

さらに要求される性質は、合成の最終段階において、ペプチド鎖の開裂、転位等を伴わず除去されうという事である。著者はこれらの条件を満たすものとして、ホルミル基を選んだ。従来、ホルミル基は、ACTH活性ペプチドで Hofmann 等^{43,44)}が示したように、稀酸で除去されるのであるが、今回著者は10%ヒドラジン酢酸で緩和に除去されることを見出し、本法を合成の最終段階に利用した。なお本基の除去に関しては、第三章第三節において詳しく述べる。

さらに本基採用の利点は、N ϵ -formyllysine を含むペプチドが、一般に水に易溶であり、その結果、合成中間体をすべてイオン交換クロマトグラフィーによって精製する事が出来た点である。

この他、9位 His のイミダゾール基が問題であるが、結合方法を選択することにより、本基を保護することなく合成を進める事とした。

以上本サルの β -MSHの合成に必要な塩基性官能基の保護基について記したが、結局4種の異った保護基が必要であり、このうちでも、後記するように、17位 Lys の ϵ -アミノ基と、6位 Arg のグアニド基の保護基の選択、およびそれらの新しい除去方法の採用が、本合成を成功に至らしめた主な点である。

2) カルボキシル基の保護基の検討

β -MSHの合成に際して、苛性アルカリで除去されるメチルエステルをAspやGluの側鎖カルボキシル基の保護基として使用する事が不適当である事は、すでにSchwyzer等³⁶⁾が示したとおりである。従来より、AspやGluを含むペプチドをアルカリ処理すると、ペプチド鎖の転位を起すことが知られており、⁴⁵⁾ ペプチドのアルカリ処理は特に注意しなければならない点である。さらに、Geschwind, Li等⁴⁶⁾はブタの β -MSHをアルカリ処理すると、13~14位のGly-Ser結合が切断される事を報告しており、この事からも、メチルエステルの使用には十分注意する必要がある。一方Schwyzer等³⁷⁾のように、8位Gluの側鎖

に *t*-butyl ester を利用しても、Boc-Met-OH の導入後、トリフルオロ酢酸で処理すれば、本エステルも除去される。

しかしながら、ペプチド合成上結合方法を選べば、アミノ成分中のカルボキシル基は、トリエチルアミン塩として保護して合成を進めることも可能であるので、一たびアミノ成分中に導入された酸性アミノ酸、この場合には、8位 Glu および 18位 Asp のカルボキシル基に保護基を残しておく必要はない。したがって著者は、これらの保護基を出来るだけ早い段階で除去して合成を進めることにした。

N末端部の Asp, Glu の側鎖カルボキシル基は、この際合成の最終段階であり、また Met が存在するので、トリフルオロ酢酸で除去出来る *t*-butyl ester として保護することにした。

その他 Ser の水酸基、Tyr のフェノール性水酸基は、結合方法を選択することによって取って保護することなく合成を進める方針を立てた。

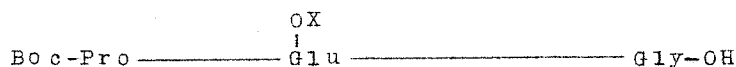
第二節 結合様式の検討

前記した保護基の選択と、ペプチド結合様式の検討は、相互に関連した問題である。ペプチドの合成は、一般にウレタン型の α -アミノ保護基を用い、C末端部より1個ずつアミノ酸を結合し、N端方向に延長するのが原則である。しかしかなり大きいペプチドの合成には、あらかじめ上記の方法で合成したペプチド間を結合する区分結合法が採用される。この区分結合に際しては、Gly を酸成分の C末端部に選ぶのが普通である。これは Gly のカルボキシル基の活性化に際してラセミ化の危険がないからである。

この原則に従って、サルの β -MSH の構造を考察すると、Gly は第3位、第13位に位置している。したがって区分合成をするとすれば、Ⅰ (1~3)、Ⅱ (4~13)、Ⅲ (14~18) の3区分が考えられる。(図5)

Ⅰ : Asp-Glu-Gly (1~3)

Ⅱ : Pro-Tyr-Arg-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly (4~13)



Ⅲ : Ser-Pro-Pro-Lys-Asp (14~18)

図5 サルの β -MSH の区分ペプチド

しかしこの区分をそのまま採用する事が出来るか否かは前述したこの区分中に含まれるアミノ

酸官能基の種類に左右されるわけである。

先ず区分ⅢはN^ε-formyllysineを採用して合成する事が可能である。つぎに問題となるのは、Ⅱ自体をⅢとの結合に都合がよいように合成出来るかという問題である。結合という点からすれば、図5のように、分子中のGluのγ-カルボキシル基は保護され、C末端部のGlyのそれは、遊離である必要がある。しかし前記したArg-Metを含むペプチドの合成に必要な条件にたえるカルボキシル基の保護基には、メチルあるいはエチル基をおいて外にない。しかし、この種のエステルが不適当なことは前記したとおりであり、したがって此のⅡ自体を区分合成してⅢとの結合に使用する事は好ましくない。したがって、Gluをアミノ成分中に組み入れてから次にArg-Metを含むペプチドに延長する必要がある。すなわち図6に示す様に、著者は先ずZ-His-Phe-Arg(NO₂)-Trp-Gly-OHとⅢを縮合後、Gluを導入してundecapeptideとする計画に従ったが、これはZ-Glu(OBzl)-His-Phe-Arg(NO₂)-Trp-Gly-OHとⅢを結合し、接触還元しても得られるはずである。このundecapeptideにMet、つづいてArgを導入、Pro-Tyrはアチド法で導入する方法を採用して、

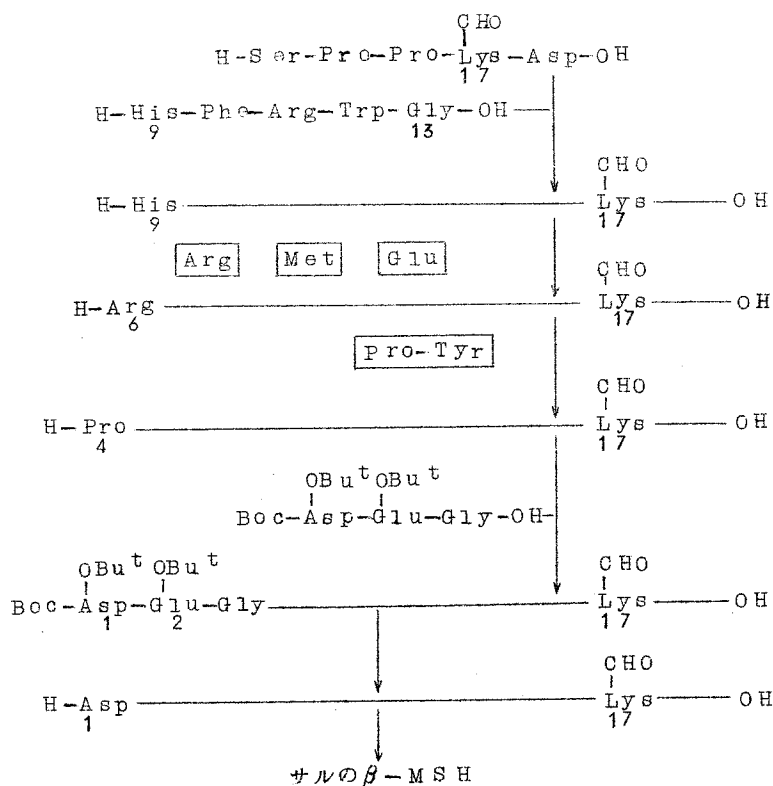


図6 サルのβ-MSHの合成計画図

pentadecapeptide. すなわち結果的にはⅡとⅢと結合したペプチドを得ることとした。この段階でⅠを結合させれば目的のサルの β -MSHに到達する事が出来るわけである。

なお本合成に際して採用したペプチド結合方法について簡単に記述する。

Ⅰ) DCC法

1955年に、Sheehan等⁴⁷⁾によって開発された方法で、ペプチド結合形成反応は図7に示すように進行するものと考えられている。本法では、アミノ成分のカルボキシル基はエステルとして保護されている必要がある。

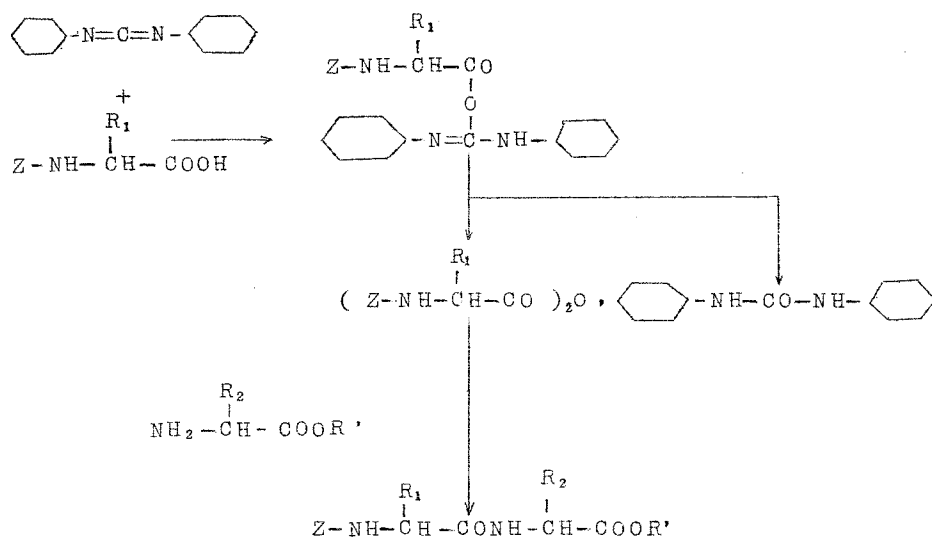


図7 DCC法によるペプチド結合形成反応

Ⅱ) 混酸無水物法 (Mix.)

本法は1951年から1952年の間に、Vaughan等⁴⁸⁾、Boissonnas⁴⁹⁾、Wieland等⁵⁰⁾によって開発されたもので、図8に示すように反応は進行する。すなわち、アシルアミノ酸の第3級アミン塩に、クロル炭酸エチル又はイソブチルを作用させてカルボキシル基を活性化し、これにアミノ成分を反応させてペプチド結合を形成する反応である。此の際アミノ成分中のカルボキシル基は、エステルでなくともトリエチルアミン塩として保護しておくこ

とが出来る。

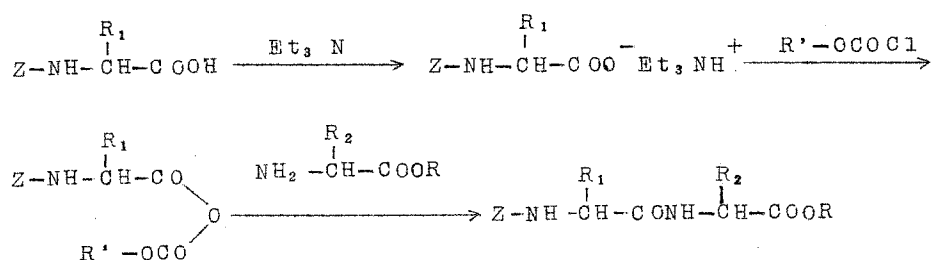


図8 混酸無水物法によるペプチド結合形成反応

iii) 活性エステル法

現在広く利用されている方法は、Bodanszky 等⁵¹⁾によって開発された *p*-nitrophenyl ester 法であり、本活性エステルはアシルアミノ酸と *p*-nitrophenol とを DCC 法で結合させて合成する。本品をアミノ成分と反応させると、アシルペプチドが形成される。*p*-Nitrophenyl ester 以外に、pentachlorophenyl⁵²⁾、*N*-hydroxysuccinimide ester⁵³⁾等が利用されている。(図9)

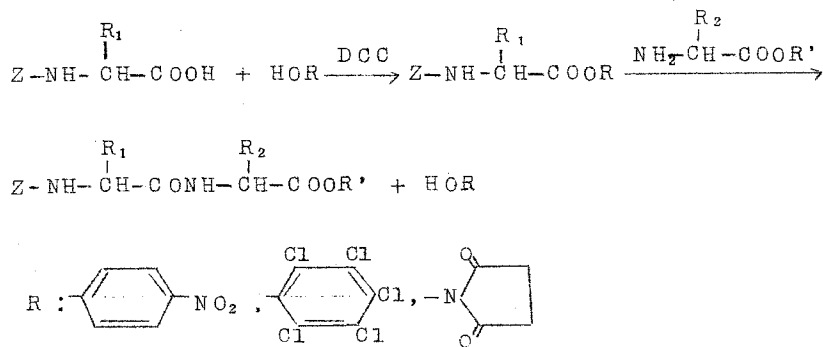


図9 活性エステル法によるペプチド結合形成反応

iv) アチド法

1904年、Crutius⁵⁴⁾によって開発された方法であり、ラセミ化を生じない優秀なペプチド結合形成法として今日なお広く用いられている。(図10)

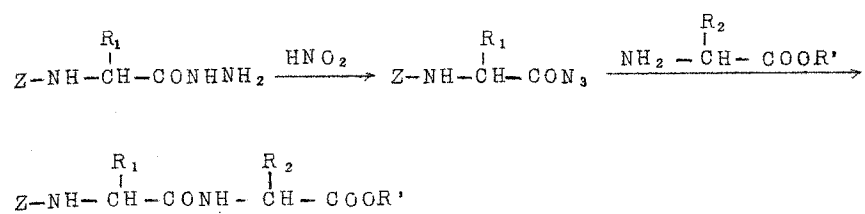


図 10 アチド法によるペプチド結合形成反応

以下、前記した合成計画にそって進めた研究結果について記述する。

第三章 H-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Fro-Fro-Lys(CHO)-Asp-CH(9~18) (22)および関連ペプチドの合成

第一節 H-Ser-Pro-Pro-Lys(CHO)-Asp-OH(14~18)(19) の合成

[3.1.1] Z-Ser-Pro-Pro-Lys(CHO)-Asp(OMe)₂(8)より
ペプチド(14~18)(19)合成の試み

著者は、まずZ-Ser-Pro-Pro-Lys(CHO)-Asp(OMe)₂を合成し、それを鹼化後、接触還元を行って目的とするH-Ser-Pro-Pro-Lys(CHO)-Asp-OHを得る可能性を検討した。

この合成原料であるH-Asp(OMe)₂は、メタノール中 thionyl chloride を作用させる方法⁵⁵⁾によって合成し、Z-Lys(CHO)-OHはHofmann等の方法⁵⁶⁾に従い図11のようにして合成した。

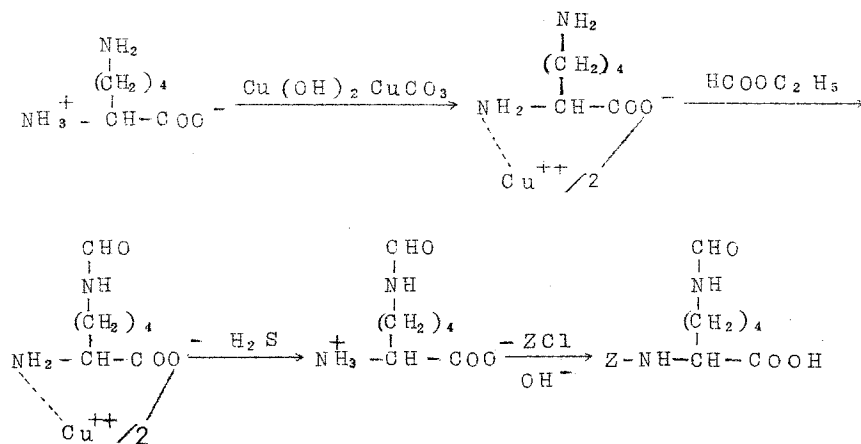


図11 Z-Lys(CHO)-OHの合成

ProはSchotten-Baumannの条件下で、常法により benzyloxycarbonyl 化した。又Z-Ser-NHNH₂はHolley等の方法⁵⁷⁾に従い合成した。以上得られた原料を用い、図12に示すように、目的とするPentaPeptide誘導体(8)の合成を行った。

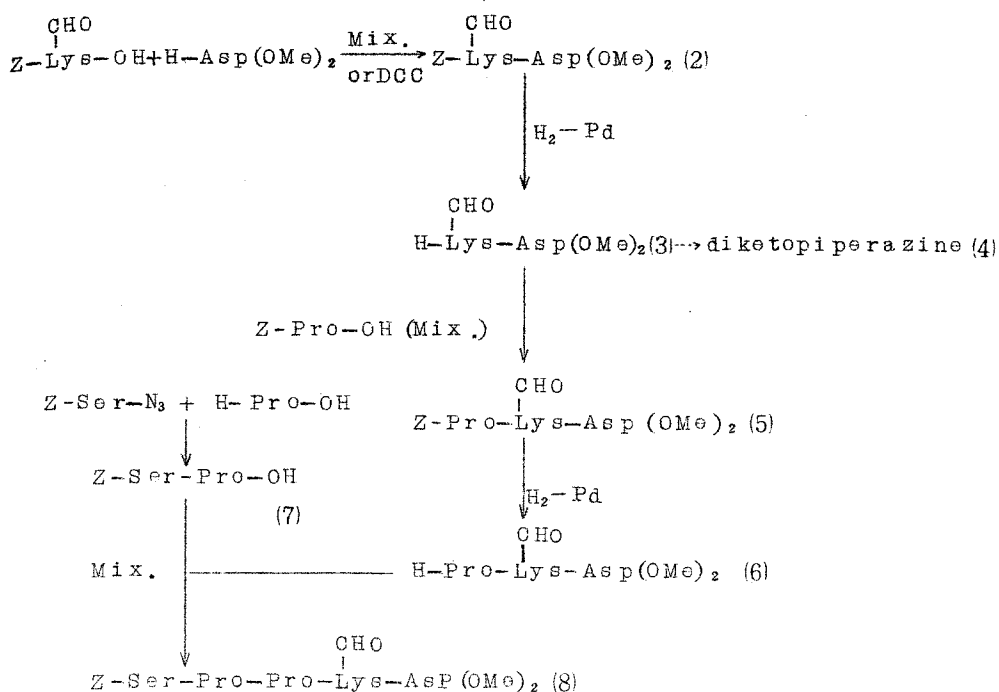


図 12 Z-Ser-Pro-Pro-Lys(CHO)-Asp(OMe)₂ (8) の合成

先ず Z-Lys(CHO)-OH と H-Asp(OMe)₂ を混酸無水物法^{48, 49, 50}、あるいは DCC 法⁴⁷により縮合し、Z-Lys(CHO)-Asp(OMe)₂ (2) を得た。Z 基を除去して (3) を得る目的で、(2) をメタノール中酢酸の存在下パラジウムを触媒とする接触還元を行った。パラジウムを濾去後、メタノールを完全に溜去し、残渣に無水エーテルを加えて白色結晶を捕捉したが、本品は予想に反してニンヒドリン反応陰性であり、その元素分析値は (3) より導かれるシケトピペラジン (4) の理論値によく一致した。このものを質量分析すると、親ピークが $m/e = 281$ に現われた。この事より本品は単量体であることがわかった。

そこで (2) を接触還元した後、シケトピペラジンの形成を避けるため、生成物を直ちに塩酸塩に導き (3) を得る事が出来た。この際水冷下 (3) の酢酸塩に、当量の冷 1 規定塩酸を加え直ちに凍結乾燥を行えば、ホルミル基は安定である。(3) に Z-Pro-OH を混酸無水物法により縮合 (5) を得た。(5) より上と同じ方法で Z 基を除去後、(6) を塩酸塩として単離した。一方 Z-Ser-Pro-OH (7) は Z-Ser-NHNH₂ と Pro のトリエチルアミン塩をアチド法により縮合して得た。本法を使用すれば Ser の水酸基を保護することなく、ペプチド結合を形成することが出来る。一方 Pro

の alkyl ester は、ジケトピペラジンを形成しやすいことが知られているので、Pro のトリエチルアミン塩を反応に用いたのである。ここに得た(6)と(7)を混酸無水物法で縮合して、目的とする pentapeptide 誘導体(8)を得た。本品は $[\alpha]_D -74.1^\circ$ の旋光度を有し、酸加水分解物のアミノ酸比は、ほぼ理論値に等しい値を示した。

著者は、まず本品に 1 規定水酸化ナトリウムを作用させて、エステルを鹼化を試みたところ、一部ペプチド結合の開裂を伴う事がわかった。すなわち、本反応混合物を Partridge 系ペーパークロマトグラフィーにかけ、ニンヒドリン呈色で調べると、Ser に対応するスポットと、その他に黄色のスポットの存在を認めた。ここに、遊離 Ser に対応するスポットが得られたという事実は、Ser-Pro 結合の開裂とともに、Ser の Z 基も、1 規定水酸化ナトリウムによって脱離する事を示唆している。すでに Schwyzer 等の実験から、ウシの β -MSH には、アルカリに不安定な結合が存在する事が類推されていたが、事実、これと共通区分をもったサルの β -MSH の C 末端 pentapeptide 中に、不安定な結合が存在する事がわかった。

一方本品を 0.5 規定塩酸中、 100°C にて 30 分間加熱した後、partridge 系のペーパークロマトグラフィーで検索すると、数個のニンヒドリン陽性のスポットが現れた。このことから、C 末端 pentapeptide は酸に対しても不安定なペプチド結合を含む事を示している。

以上の予試験から、C 末端 pentapeptide の合成に、現在の方法は不適当であり、出来るだけ早い段階で、C 末端カルボキシル基の保護基を除去しておく必要があると判断される。

[3.1.2] H-Ser-Pro-Pro-Lys (CHO) -Asp-OH (14~18) (19) の合成

前節に記した様に、本ペプチド区分中には、酸、アルカリに対し不安定な Ser-Pro という結合が含まれている。著者はそれ等を考慮し、図 13 に示す様な方法で、本品の合成を行った。

まず前節で得た Z-Lys (CHO) -Asp- (OMe)₂ (2) をメタノールに溶かし、2 当量の 1 規定水酸化ナトリウムにて、メチルエステルを鹼化して、結晶性の Z-Lys (CHO) -Asp-OH (9) を得た。この際、鹼化後、反応液を酢酸又はクエン酸にて酸性にしても、目的物は直ちに析出しないが、1 規定塩酸を用いて pH 3 附近にし、冷蔵庫に放置すると、はじめて結晶が析出した。本品は Z-Lys (CHO) -OH と Asp のトリエチルアミン塩を混酸無水物法で縮合しても得られるが、前法より収量が悪い事がわかった。本品(9)をメタノール中常法により接触還元を行い、結晶性の H-Lys (CHO) -Asp-OH (10) を得た。(10) と Z-Pro-OH を混酸無水物法又は *p*-nitrophenyl ester 法⁵¹⁾により縮合して、Z-Pro-Lys (CHO) -Asp-OH (11) を得たが、後者による方が好収量を与えた。さらに本品(11)は、前節で得た Z-Pro-Lys (CHO) -

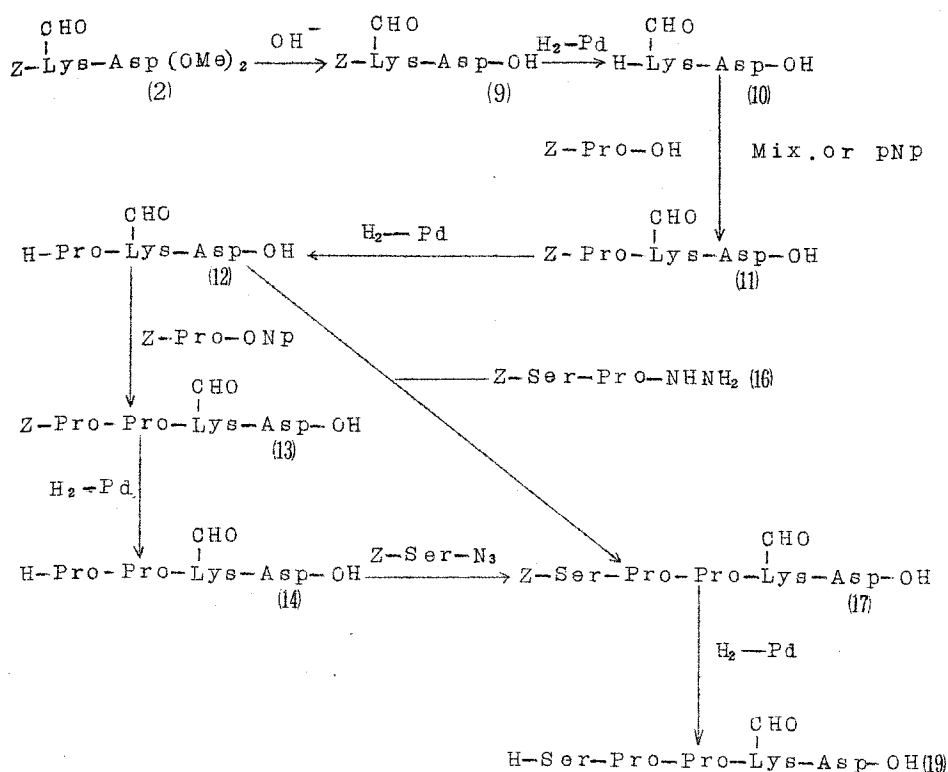


図 13 H-Ser-Pro-Pro-Lys (CHO) -Asp-OH (19) の合成

Asp-(OMe)₂ (5) の 1 規定水酸化ナトリウムによる鹼化でも得られたが、収量が悪かった。(11) を常法により接触還元して保護基を除去し、H-Pro-Lys (CHO) -Asp-OH (12) を得た。

本品(12)のトリエチルアミン塩と、Z-Pro-ONp とを反応させ、*n*-ブタノール抽出によって Z-Pro-Pro-Lys (CHO) -Asp-OH (13) を捕捉し、ついでメタノールより酢酸エチルで沈澱させて精製した。本品は無晶形であるが、dicyclohexylamine 塩の結晶として単離する事が出来た。(13) を常法に従って接触還元後、凍結乾燥して、H-Pro-Pro-Lys (CHO) -Asp-OH (14) の羽毛状粉末を得た。次に Z-Ser-NHNH₂ を冷時塩酸の存在下、亜硝酸ナトリウムを作用させて、そのアチドに導き、先に得た(14)のトリエチルアミン塩と反応させて、Z-Ser-Pro-Pro-Lys (CHO) -Asp-OH (17) を得た。本品は、Z-Ser-Pro-NHNH₂ (16) から導いた Z-Ser-Pro-N₃ と H-Pro-Lys (CHO) -Asp-OH (12) とを縮合しても得る事が出来た。

が、収率は前法の方が良かった。

さらに、Z-Ser-Pro-OH(7)とH-Pro-Lys (CHO)-Asp-OH (12)をクロル炭酸エチルを用いての混酸無水物法により結合させようとしたが、目的物(17)は少ししか得られず、大部分ウレタン型副反応物、N^α-EtO-CO-Pro-Lys (CHO)-Asp-OH(18) が得られた。(18)の酸加水分解物中には、予想とする Serが含まれていなくて、Pro も1モルしか含まれていない。又重クロロホルムを溶媒として、本品のNMRを測定した結果、8.80 τ (triplet, J=7 cps) と5.82 τ (quartet, J=7 cps) にエチル基に由来するシグナルが現れた。したがって本反応において、試薬がアミノ成分と反応したことは明らかである。混酸無水物法におけるこの種の副反応については、これまでに少数の報告が見られるが、^{58,59,60}) 特に Pro をN末端にすると此の傾向が強いようである。

(17)をメタノール中、常法により接触還元した後、凍結乾燥して、目的とするH-Ser-Pro-Pro-Lys (CHO)-Asp-OH(19)を白色羽毛状粉末として得た。本品はPartridge 系ならびにsec-butanol-ammonia 系のペーパークロマトグラフィーにおいて、それぞれニヒドリン反応陽性の単一スポットを示した。本呈色は最初黄色をおびた紫色であるが熱すると直ちに紫色に変わった。

本品を定沸点塩酸 (b.p.110°, 6規定) で加水分解し、そのアミノ酸分析を行った結果、そのアミノ酸比は、理論値に等しい値を示した。

又leucine amino peptidase (以下LAPと略す) による消化物のアミノ酸比は理論値に等しくN^ε-formyllysine を1モル回収した。一般にペプチド中のプロリン結合は、高度に精製したLAPによっては開裂しないことが知られている。⁶¹⁾ しかしここに使用したLAPは豚の腎臓よりSpackman等の方法⁶²⁾に従って二回硫酸分画して調製した粗製品であり、恐らくProlidase を含んでいるので定量的に本ペプチドが水解されたものと考えられる。この種の例は、すでにHofmann等⁴³⁾によって報告されている。

以上の実験事実から、本品はL型アミノ酸残基で構成された、光学的にも純粋な pentapeptideであり、合成途上、ホルミル基は安定であった事がわかった。

第二節 H-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys (CHO)-Asp-OH (9~18) (22)の合成

著者は前節に記したように、サルの β -MSHのC末端N^ε-formylpentapeptide, H-Ser-Pro-Pro-Lys (CHO)-Asp-OH (19)の合成に成功したのであるが、ついで本

品をアミノ成分とし、これに Z-His-Phe-Arg(NO₂)-Trp-Gly-OH (20) を縮合して、C 端 N^ε-formyldecapeptide (22) に導いた。(図 14)

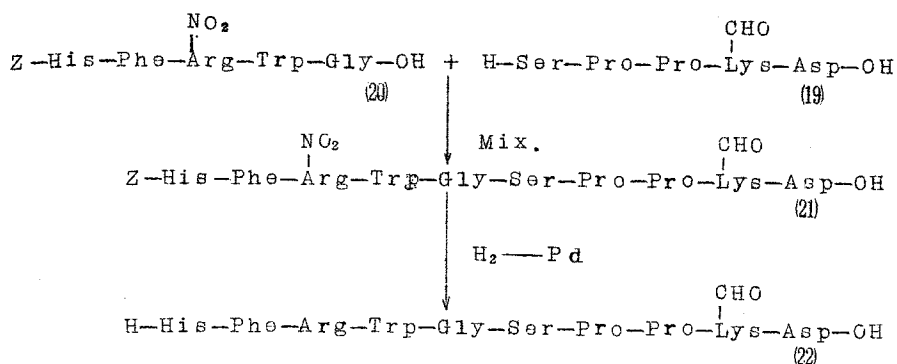


図 14 C 端 formyldecapeptide (22) の合成

まず原料となる(20)はα-MSHの合成原料でもあるため、現在までにその合成方法は種々検討されている。著者はこのうち、Hofmann, Lande⁶³⁾の方法に従って図 15 に示すように本品を合成した。

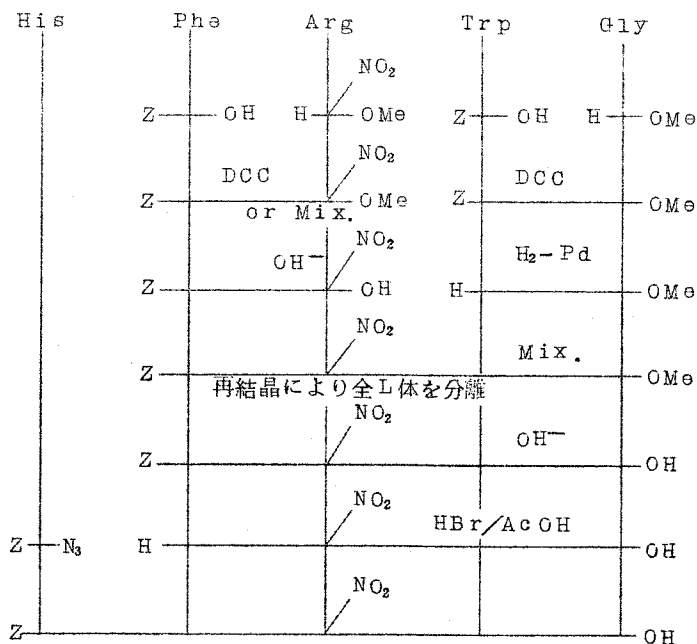


図 15

Z-His-Phe-Arg(NO₂)-Trp-Gly-OH (20) の合成

次いでペプチド(20)と(19)の結合であるが、この縮合はGlyの個所であるため、いかなるカルボキシル基の活性化法を採用しても、ラセミ化の心配はない。しかしながら活性化の方法に問題がある。なぜならば、著者の行おうとする本結合においては、アミノ成分であるN^ε-formyl-pentapeptide(19)のカルボキシル基が保護されていないので、DCC等による直接結合法は採用出来ない。そこで先ず活性エステル法による結合反応を検討した。しかしこの際の結合は、ペプチド間の結合であるため、1個のアミノ酸の活性エステル法とはかなりおもむきを異にしている。

先ずacylpeptideと*p*-nitrophenol又はpentachlorophenol等の水酸基を、DCCを用いて縮合して活性エステルを作る方法であるが、本法においては、副反応、acylpeptide ureaの生成を防止する事はむずかしい。そのためIselin等⁶⁴⁾はacylpeptideとdi-*p*-nitrophenyl sulfiteと反応させて、acylpeptide *p*-nitrophenyl esterを合成する方法について報告しており、榊原等⁶⁵⁾はトリフルオロ酢酸の活性エステルとacylpeptideとのエステル交換によりacylpeptideの活性エステルを合成する方法について報告している。

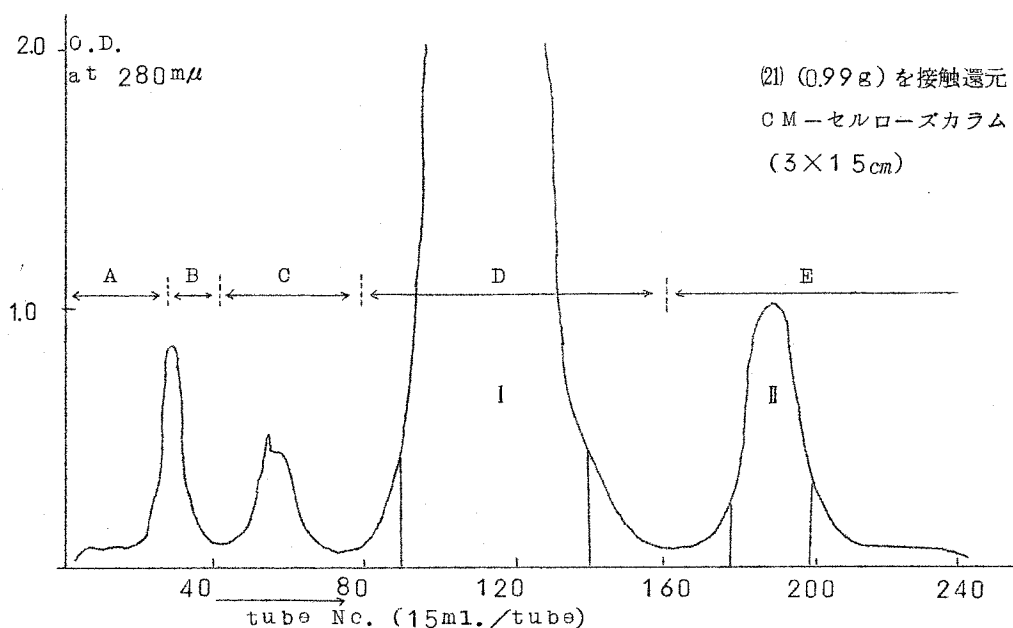
最近Anderson等⁶⁶⁾は、混酸無水物法により、acylpeptide N-hydroxysuccinimide esterを合成する方法を、又Kovacs等⁶⁷⁾はDCCとpentachlorophenolとのcomplexを、acylpeptideと反応させて活性エステルを合成する方法を報告している。

以上の事柄を参考にして、(20)と(19)のペプチド区分結合を種々検討したが、いずれも不成功に終わった。これはおそらく(20)中のHisのイミダゾール核が保護されていないためと考えられる。

しかしながら図14のように、DMFを溶媒とし、混酸無水物法により(20)と(19)の縮合を試みた所、良好に反応が進行し、Z-His-Phe-Arg(NO₂)-Trp-Gly-Ser-pro-Pro-Lys(CHO)-Asp-OH(21)を得る事が出来た。本品を精製する事なく、50%酢酸にとかし、パラジウムを触媒とする接触還元を行ない、Partridge系のペーパークロマトグラフィーで検索したところ、Rf 0.27のスポットの他に、Rf 0.50に未反応の(20)に由来するHis-Phe-Arg-Trp-Glyに相当するスポットの存在を認めた。本粗製品を、ピリジン酢酸緩衝液を用いてCM-セルローズのカラムクロマトグラフィーを行って精製し、溶出する各フラクションの280mμにおける吸光度を測定したが、その溶出曲線は図16に示す如くである。0.05M流出部分(画分1)を集め、溶媒を溜去後、凍結乾燥を行い目的とするH-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys(CHO)-Asp-OH(22)を白色羽毛状粉末として、30~40%の収量で得る事が出来た。こ

のものは partridge 系, *sec*-butanol-ammonia 系のペーパークロマトグラフィーにおいて, ニンヒドリン, Ehrlich, 坂口, Pauly 反応に陽性の単一スポットを示し, ピリジン酢酸緩衝液 (pH 3.5, 6.8) を溶媒とする濾紙電気泳動においても単一スポットを示した。本品の酸加水分解物のアミノ酸比は理論値とよく一致した。一方本品を常法により LAP (Spackman 等の方法で製した粗製品)⁶²⁾ で消化し, その消化物のアミノ酸分析を行った結果, C 端 pentapeptide 中のアミノ酸の回収率が多少悪かったが, このように比較的長いペプチドを一般的方法で LAP 処理した際に, これと同様の現象が生ずる事はすでに報告されている。^{43,44)} そこで 38 °C にて 24 時間 LAP 消化を行った後, さらに同量の LAP を加え 24 時間 incubate を続け, そのアミノ酸分析を行った結果, そのアミノ酸比は理論値と一致し, 1 モルの N^ε-formyllysine を回収した。

なお画分 II に, H-His-Phe-Arg-Trp-Gly-OH を分離した。



A: H₂O (400ml.), B: 0.01M ピリジン酢酸緩衝液 (150ml.)
C: 0.025M (600ml.), D: 0.05M (1200ml.), E: 0.1 M (900ml.)

図16 (22)のCM-セルローズカラムクロマトグラフィーによる精製

第三節 脱ホルミル化反応の検討と、

H-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys-

Asp-OH (9~18) (23) の合成

第二章第一節に記したように、著者の計画したサルの β -MSHの合成では、その最終段階において、17位 Lys の ϵ -アミノ基についたホルミル基を除去しなければならない。先ず N^{ϵ} -formyllysine を用い、その緩和な除去の条件について種々検索し、ついでこの条件下に、前節で得た N^{ϵ} -formyldecapeptide (22) を遊離の H-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys-Asp-OH (23) に導くことが出来るか否かを検討した。

まず脱ホルミル反応の検討であるが、本基は一般に稀塩酸で除去する事が可能である。したがって、Sheehan 等⁶⁸⁾ はホルミル基をアミノ酸の α -アミノ基の保護基に利用して、2,3 のペプチドを合成したが、Lys の ϵ -アミノ基についたホルミル基は、稀塩酸に対しかなり抵抗を示す。事実、Hofmann 等^{43,44)} は ACTH に関連した、eicosapeptide, triicosapeptide 中の Lys の ϵ -アミノ基についたホルミル基を、0.5 規定塩酸と煮沸する事により除去した。しかし彼等は、この際ある程度ペプチド結合の開裂がさけられなかった事を報告している。

著者は本章第一節において、C 端 pentapeptide, Z-Ser-Pro-Pro-Lys (CHO)-Asp (OMe)₂ (8) を、0.5 規定塩酸と30分間煮沸する事により、ペプチド結合の開裂を伴う事を認めている。このペプチド中特に、Ser-Pro の結合が酸、アルカリに弱い事は第一節に指摘したとおりである。

以上の予試験の結果から、稀塩酸による脱ホルミル化反応を本 β -MSH 合成の最終段階に適用する事は好ましくないと判断され、したがってより緩和な条件が要求される。ここで著者は、宮本等、⁶⁹⁾ Lefrancier 等⁷⁰⁾ がホルミル基を高濃度のヒドラジンにより除去した報告に注目した。まず著者はこの条件を少しく緩和にし、 N^{ϵ} -formyllysine を15%ヒドラジンにて、38°, 48時間処理したところほとんど定量的に Lys を得る事が出来た。本品の旋光度、融点、IR スペクトルは標品のそれらと完全に一致し、本処理によって Lys はラセミ化しない事が確実となった。

以上の結果をもとにして、図17に示すように、C 端 N^{ϵ} -formyldecapeptide (22) のホルミル基の除去反応を行った。すなわち H-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-

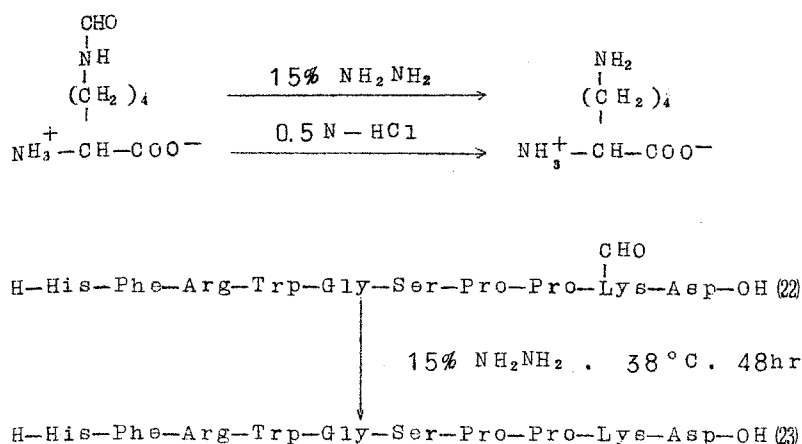


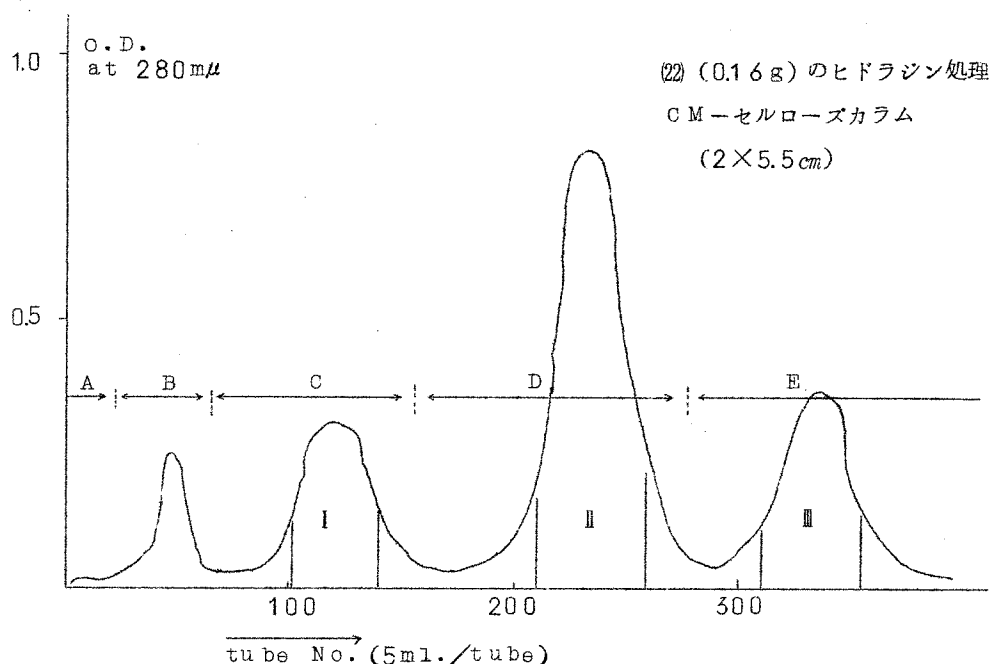
図17 脱ホルミル化反応の検討

Pro-Lys (CHO)-Asp-OH (22) を 15% ヒドラジンにて、38 °、48 時間処理し、反応混合物を Partridge 系ペーパークロマトグラフィーで検索すると、Rf 0.22 (主成分)、0.27、0.49 (微量成分) と 3 つのスポットが現れた。このうち Rf 0.27 は未反応の (22) に相当し、非常にうすい Rf 0.47 は、ペプチド結合の開裂により生じた副反応物と思われる。この粗製品を、ピリジン酢酸緩衝液を用いて、CM-セルローズカラムクロマトグラフィーにより精製した。その溶出曲線は、図18のごとくである。0.1 M 流出部分 (画分Ⅱ) を集め、溶媒を溜去後、凍結乾燥して目的とする (23) を羽毛状粉末として 45 % の収量で得る事が出来た。本品はペーパークロマトグラフィー、濾紙電気泳動において、それぞれ単一のスポットを示した。

本品の元素分析値は、2 分子の酢酸、1.1 分子の水のついた理論値によく一致するが、これは本ペプチドが非常に吸湿性であるためと考えられる。本品の酸加水分解物のアミノ酸比は理論値と一致した。又前節と同じ方法で L A P (粗製) ⁶²⁾ 消化を行い、そのアミノ酸分析を行ったが、そのアミノ酸比は理論値と一致し、1 モルの Lys を回収した。これ等の事実は、脱ホルミル化反応が満足に進行した事を証明するとともに、本処理中に構成アミノ酸が何ラセミ化しなかったことを示すものである。

目的とするペプチド以外に、0.05 M 流出部分 (画分Ⅰ) に原料である (22) を 18 % 回収し、又 0.2 M 流出部分 (画分Ⅱ) にペプチド中の Gly-Ser 結合が開裂して生じた H-His-Phe-Arg-Trp-Gly-OH を 9 % の量で得た。ここに見られたペプチド結合開裂の現象、すなわち Gly-Ser 結合が開裂しやすいという事は、すでに文献にも記載されたことであって、⁷¹⁾ こ

れはおそらく主としてN→O転位を経過するものであろう。前記したように、Geschwind等⁴⁶⁾は豚、牛の β -MSHを0.1規定水酸化ナトリウムで処理すると、Gly-Ser結合の開裂を伴う事を報告している。したがって前記したSer-Pro結合とともに、結局Gly-Ser-Proという非常に加水分解されやすい結合が、 β -MSH中に存在する事が確められた。



A: H_2O (100ml.), B: 0.02Mピリジン酢酸緩衝液 (200 ml.)

C: 0.05M (450ml.), D: 0.1M (700ml.), E: 0.2M (200ml.)

図18 (22)のCM-セルローズカラムクロマトグラフィーによる精製

以上実施した、稀ヒドラジンによる脱ホルミル化反応は、前記の稀塩酸による反応に比較すれば、かなり緩和な条件といえよう。しかし此の際にも、ペプチド鎖の開裂がたとえわずかでも生じたという事実は、主としてヒドラジン自身のかかなり強い塩基性に起因するものと考えられ、さらにこの塩基性は、ペプチド鎖の開裂以外に、分子中のArgをOrnへ変換する危険を宿している。幸にして、上記反応で得たdecapeptide (22)の酸加水分解物のアミノ酸分析結果からわかるように、ほぼ満足のArgの回収率が得られているので、本副反応はたとえ生じたとしても無視出来るものであったことがわかる。しかしさらに緩和な反応条件が好ましいことは当然であ

る。そこで上記の方法を改良し、10%ヒドラジン酢酸でPH6附近で、N^ε-formyllysineおよびN^ε-formyldecapeptide(22)を、38°、48時間あるいは85~90°、3時間反応すれば、脱ホルミル化反応は満足に進行し、しかもペプチド結合の開裂がほとんど見られない事を薄層クロマトグラフィーで認めた。此の条件は、上記したArgの分解反応が起きる危険をさらに減少したものと考える。事実矢島、川崎等⁷²⁾は此の条件を利用して、Argを含む〔11-N^ε-formyllysine〕-α-MSHをα-MSH自体に導くことに成功し、著者も又此の条件を非常に加水分解されやすいペプチド結合を持ったサルのβ-MSHの最終段階に応用することがもっとも好ましいと結論するに至った。

第四節 関連ペプチド，H-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-OH (10~16) (29) の合成

前記したようにβ-MSH合成に必要なN^ε-formyldecapeptide(22)を合成したのであるが、ここに関連ペプチドの合成について述べる。

1965年、Lande等²⁵⁾は豚の脳下垂体より、α-, β-MSHの他にβ-MSHの10位から16位までのアミノ酸配列に相当するheptapeptide, H-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-OH(29)を分離し、本品が10⁸レベルのMSH活性を有すると報告した。こ

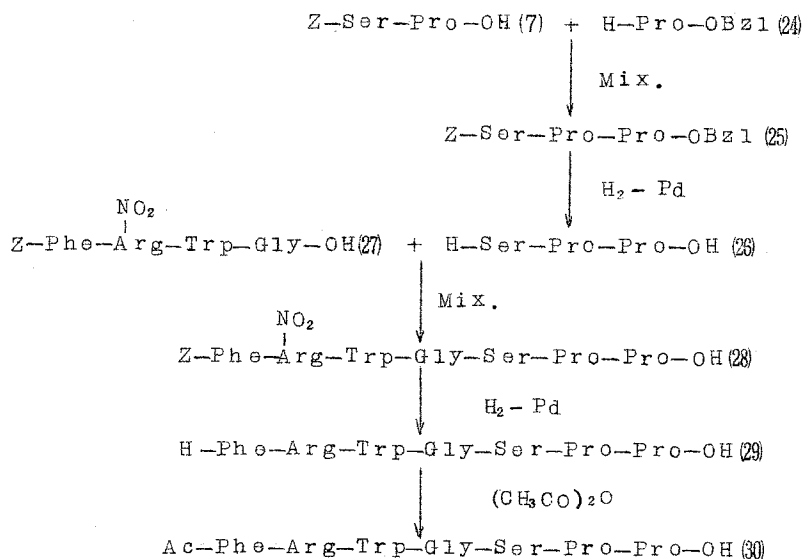
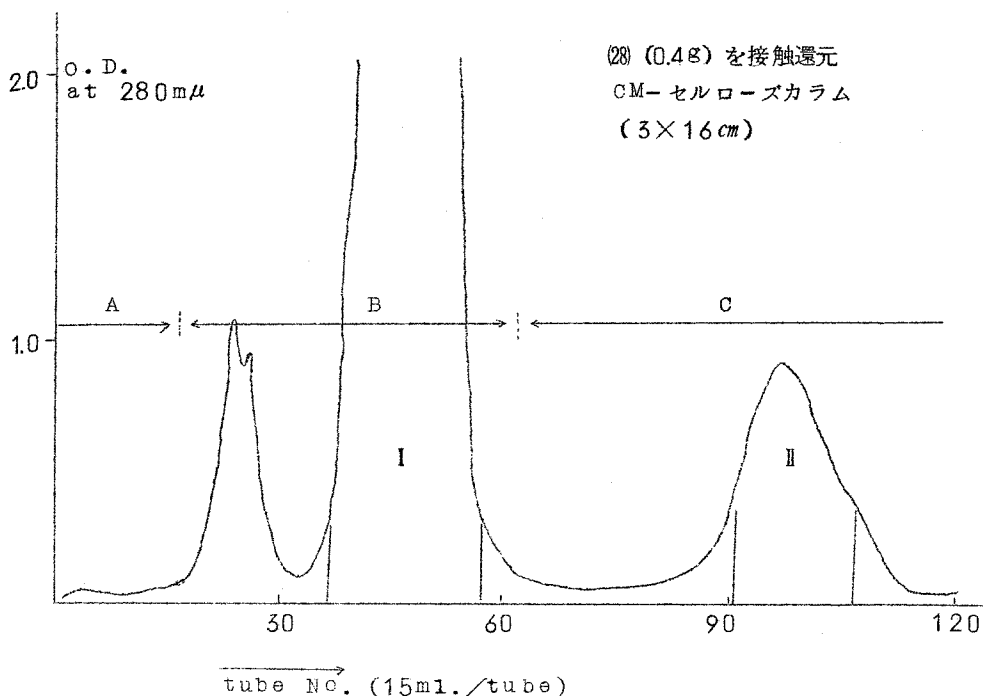


図19 heptapeptide (10~16) (29) の合成

のペプチドは、丁度サルの β -MSHの10位から16位までのアミノ酸配列にも相当するものである。すでに第一章に記したように、MSH活性発現にはHisが重要と考えられているが、これを含まないペプチドに活性があるのは疑問視せられる。そこで著者は生物検定の目的から、図19に示すようにして本heptapeptide(24)を合成した。

先ず第三章第一節に記したZ-Ser-Pro-OH(7)とH-Pro-OBzl(24)とを混酸無水物法で縮合し、Z-Ser-Pro-Pro-OBzl(25)を得た後、メタノール中パラジウムを触媒とする接触還元を行い、アミノ基およびカルボキシル基の保護基を同時に除去してC端 tripeptide, H-Ser-Pro-Pro-OH(26)を得る事が出来た。本品は2個のProを含むので、予想どおり高い旋光性を示した。一般にPro-Proのalkyl esterはシケトピペラジンを形成しやすい事が知られている。⁷³⁾したがって本合成においては、ProとProの間を結合する事によりそれを避ける事が出来たのである。

次に、Hofmann, Lande⁶³⁾の方法に従って合成した、Z-Phe-Arg(NO₂)-Trp-Gly-OH(27)と(26)を混酸無水物法で縮合し、得られた粗製のZ-Phe-Arg(NO₂)-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-OH(28)を直ちに40%酢酸中接触還元してすべての保護基を除去した後、ピリジン酢酸緩衝液を用いCM-セルローズカラムクロマトグラフィーを行って精製した。溶出曲線は図20のごとくであり、0.025M流出部分(画分I)に目的とするペプチド(26)を得た。本品はペーパクロマトグラフィーにおいて、ニンヒドリン、Ehrlich、坂口反応陽性の単一スポットを示し、その酸加水分解物、LAP(粗製)消化物のアミノ酸比は、それぞれ理論値に一致した。又本品はLande等²⁵⁾が豚の脳下垂体から単離した(29)とシリカゲル、セルローズの薄層クロマトグラフィー、および濾紙電気泳動において全く同一の挙動を示した。又画分IIから原料(27)に由来するH-Phe-Arg-Trp-Gly-OHを回収した。



A: H_2O (300ml.). B: 0.025M ピリジン酢酸緩衝液 (660ml.)
C: 0.05M (825ml.)

図20 (29)のCM-セルローズカラムクロマトグラフィによる精製

一般にMSH作用に関して、アミノ基遊離のペプチドより、相当するN-acetylpeptideの方が、活性が大である事が知られている。⁷⁴⁾そこで、著者はheptapeptide (29)を無水酢酸と反応させ、生成したN-アセチル体(30)を、水を溶媒とするCM-セルローズカラムクロマトグラフィを行って精製した。

合成heptapeptide (29)、およびそのアセチル体(30)は、Yale大学のLande博士のもとで生物検定にかけられたが、ともに天然品と異って何らMSH活性を示さなかった。以上のことから、Lande等の得た天然品(29)の示す活性は、おそらく高いMSH活性を示す微量の物質の混在に起因するのであろうと推論された。

Fig. 20

第四章 H-Pro-Tyr-Arg-Met-OH(4~7)(41) の合成

第一節 H-Arg-Met-OH (6~7) (37) の合成

著者は、前章までにサルの β -MSHのC端N^ε-formyl decapeptide, H-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys(CHO)-Asp-OH(22)の合成について記したが、さらにこのN端側にGluを導入した後、Pro-Tyr-Arg-Met というアミノ酸配列を有するペプチドを延長しなければならない。すでに第二章第一節アミノ保護基の検討の項で一部ふれたように、Gluの導入は、従来通り、接触還元で除去出来る保護基を利用して行うことが可能である。しかし硫黄原子を持ったMetの導入後にZ基を使用した際にはもはやそれを接触還元によって除去する事は出来ないし、又水酢酸中臭化水素によるZ基の除去は、Lysについたホルミル基をも除去してしまうので採用出来ない。したがって、緩和に、しかもホルミル基をおかさないという条件で除去出来る保護基の利用が必要となる。

この目的に沿った保護基として、トリフルオロ酢酸で除去出来るt-butoxycarbonyl (Boc) 基が最適と考えられるが、Argのグアニド基には、さらにもう一つの保護基が必要である。図21、Xで示した保護基は、接触還元、臭化水素以外の方法で、しかもホルミル基をおかさない方法で除去されねばならず、このペプチド鎖の延長は非常な困難に遭遇するわけである。事実、いまだH-Arg-Met-OH およびこれを含むペプチドの合成に関する報告は見当らない。そこで著者は、まずH-Arg-Met-OH 自体の合成について種々の検討を加えた。

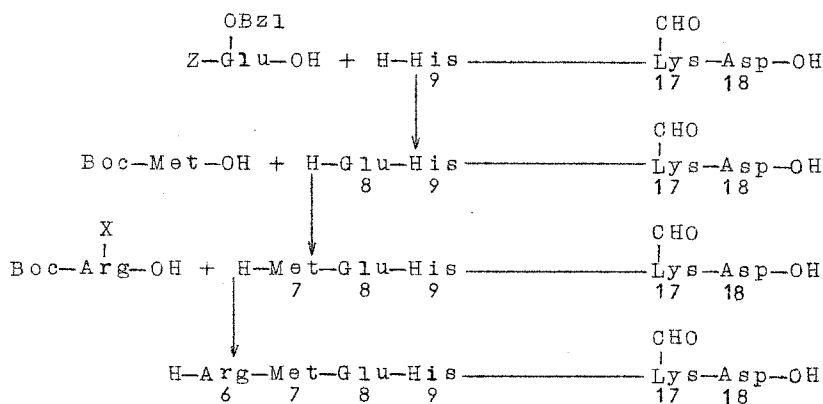


図21 C端 tridecapeptide誘導体の合成

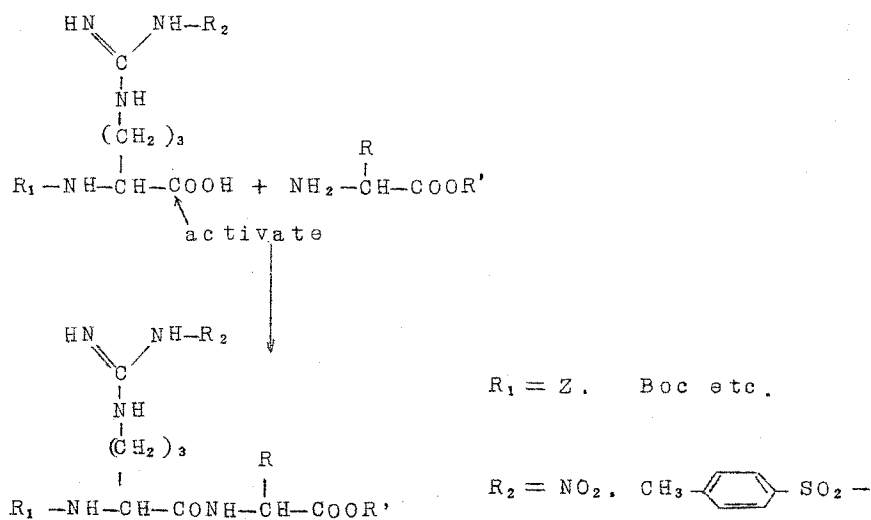
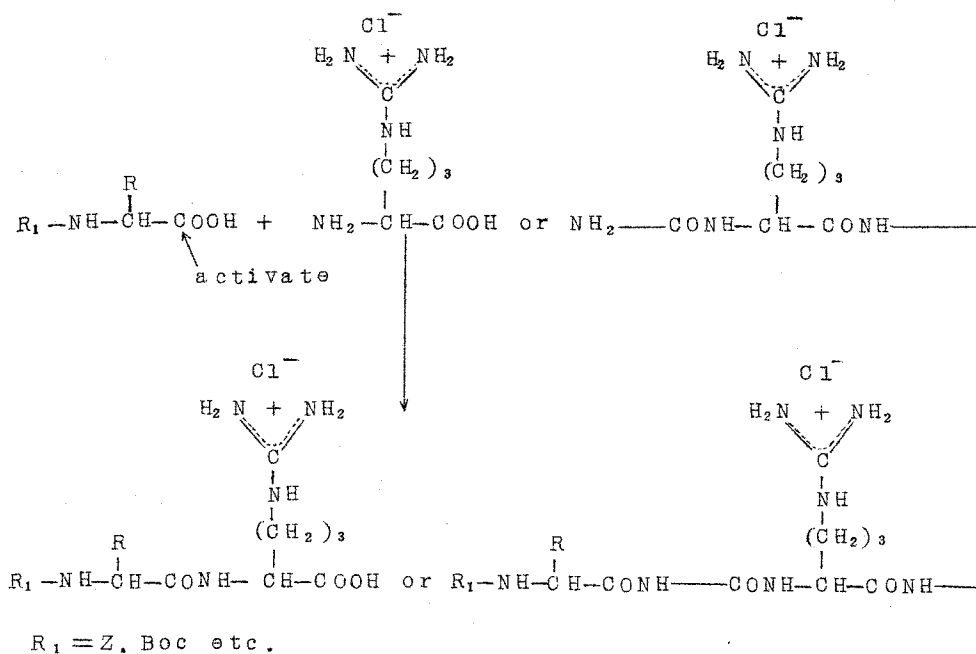


図22 アルギニンおよびアルギニンペプチドのペプチド結合形成反応

図22に示すように、ペプチド合成において、Arg又はこれを含むペプチドをアミノ成分として用いた際には、そのグアニド基を塩酸等でプロトン化しておけば副反応を伴うことなくペプチド結合を形成する事が出来る。⁷⁵⁾ しかしながら、Argのカルボキシル基を活性化しようとする際には、 α -アミノ基およびグアニド基を保護しておく必要がある。さもないと分子内にラクタムを形成するからである。このグアニド基の保護基としてもっとも一般的なものはニトロ基^{76, 77)}であって、このニトロ基はパラジウムを触媒とする接触還元により容易に除去する事が可能である。しかし上記したように、硫黄を含むアミノ酸、例えばMet, cysteine (Cys) がN^G-nitroarginineと共存する際には、常法である接触還元によってニトロ基を除去することが出来ない。

そこで別のニトロ基除去方法として、Clubb等⁷⁸⁾ Scopes等⁷⁹⁾は電解還元による除去について報告しているが、Gros等⁸⁰⁾は、この還元においてはしばしば中間体であるaminoguanidinoの段階で反応が止る事を指摘している。一方最近Kung等⁸¹⁾は、牛のインスリンB鎖の合成にN^G-nitroarginineを用い、最終段階において液体アンモニア中金属ナトリウム処理を行ってニトロ基を除去したと報告しているが、本条件下ではニトロ基の除去は完全に進行しない事が知られており^{82, 83)}、事実著者は、Z-Arg(NO₂)-Met-OH (34)を液体アンモニア中金属ナトリウムで処理したが、数種の混合物の生成を認めた。したがってN^G-nitroarginineを使用して、H-Arg-Met-OHを合成する事は、従来の方法では不可能に近いのである。

次にグアニド基の保護に使用されているのはtosyl基(Tos)であって、液体アンモニア中金属ナトリウムの作用で除去出来る。事実著者は図23に示すように、Z-Arg(Tos)-Met-OH (32)から同処理で、H-Arg-Met-OH (37)をはじめて合成する事が出来た。しかし此の操作がArg-Metを含むすべてのペプチドに応用されるか否かは問題であって、前記したようにSchwyzer等によるウシの β -MSHの合成が、同処理の結果不成功に終わっていることを考えると、本サルの β -MSHの合成に適用出来る可能性は少いのである。従って、N^G-tosylarginineの利用はこの際好ましくない。

このような状況下に前記したように著者はN ^{α} , N^G-di-*t*-butoxycarbonylarginine⁴¹⁾の利用を考慮した。すべてのBoc基はトリフルオロ酢酸で除去されるはずであるが、未だ高級ペプチドの合成に、本アルギニン誘導体は利用された事がない。本法を検討中たまたまN^G-nitroarginineをArgにもどす二つの方法が発表された。その一つは榊原等⁴²⁾による弗化水素法であり、他は早川等⁸⁴⁾による塩化第一錫による還元法である。

図23に示すように、先ずZ-Arg(NO₂)-Met-OH(34)を榊原の方法にならい、弗化水素中、0°、30分間取扱った後、Amberlite IRA-400によってアセテート型にかえ、水とエタノールより再結晶して、H-Arg-Met-OH(37)を好収率で得る事が出来た。本品は、上記N^G-tosylarginine誘導体より得た標品と完全に一致した。つぎにこのH-Arg-Met-OH(37)は早川等の方法にならい、Boc-Arg(NO₂)-Met-OH(36)をギ酸中塩化第一錫で、50°、14時間還元しても得られることがわかったが、この場合収率は前法に比して悪かった。

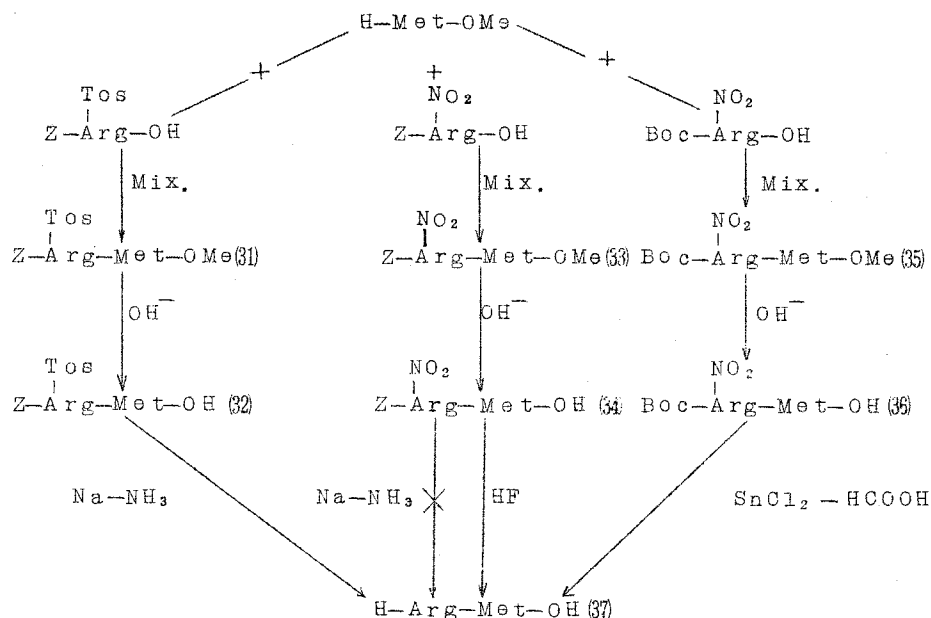


図23 H-Arg-Met-OH(37)の合成の検討

以上著者は、H-Arg-Met-OH を三つの異った方法で合成することが出来たが、このうち液体アンモニア中金属ナトリウムによる方法は、すでに上記した理由で好ましくない。そこで弗化水素法と、塩化第一錫による方法であるが、著者の場合サルのβ-MSHの17位Lysについたホルミル基の安定性を考慮しなければならない。そこで、N^ε-formyllysineを弗化水素、およびギ酸中塩化第一錫で処理したところ、後者の場合すなわちギ酸中長時間反応する間に、少量の脱ホルミル化反応を生じる事を認めたが、前者すなわち弗化水素処理では、何らLys

の生成は認められなかった。楠原等⁴²⁾も α -アミノ基についたホルミル基は本反応条件下に安定であることを記述している。

以上の事実から、弗化水素法はH-Arg-Met-OH (37) の合成に最も適したものであり、此の際Arg のもっとも一般的な誘導体、N^G-nitroarginineを使用することが可能であることがわかった。又これを著者の必要とするペプチド鎖の延長という点からみれば、本弗化水素におかされないホルミル基の有用性をうかがい知ることが出来る。

第二節 H-Pro-Tyr-Arg-Met-OH (4~7) (41)の合成

著者は先に、H-Arg-Met-OH (37) の合成について記したが、このN端部に、さらに、Pro-Tyr を結合し、ペプチド鎖の延長に必要な基礎的実験を行った。合成方法を図24に示す。

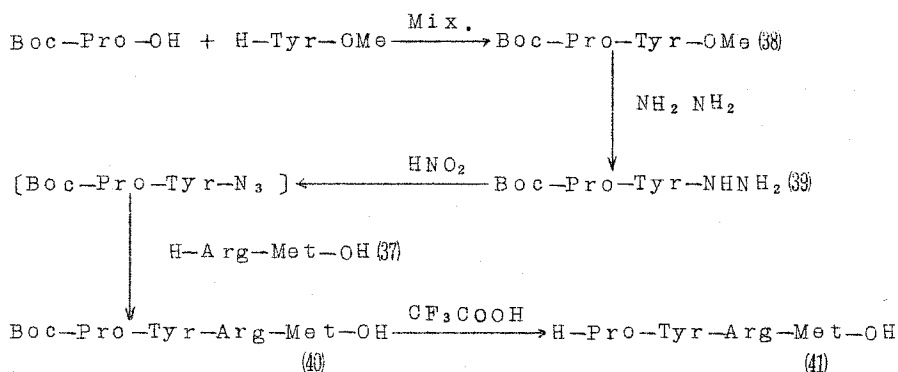


図24 H-Pro-Tyr-Arg-Met-OH (41)の合成

先ず、Boc-Pro-OH と H-Tyr-OMe を混酸無水物法で縮合後、ヒドラジン処理して Boc-Pro-Tyr-NHNH₂ (39)を得た。本品と先に合成した H-Arg-Met-OH (37) をアチド法により縮合した。この際 Boc基が塩酸に対し不安定であるため、著者はBoc-Pro-Tyr-NHNH₂ (39)をDMFに溶かし、正確に当量の亜硝酸ナトリウムを加え、寒剤(氷と食塩)で冷却した後、2倍量の冷1規定塩酸を滴下して対応のアチドに導いた。反応液をトリエチルアミン中和後、H-Arg-Met-OH (37)と反応させると、反応は容易に進行し、Boc-Pro-Tyr-Arg-Met-OH (40)を得る事が出来た。本品を常法によりトリフルオロ酢酸処理して、目的とする H-Pro-Tyr-Arg-Met-OH (41)を得た。CM-セルローズカラムクロマトグラフィーで精製した

tetrapeptide (41)の酸加水分解物のみならず、LAP (粗製品)⁶²⁾ 消化物のアミノ酸比は理論値と一致した。このことは、本ペプチドがラセミ化なく合成されたことを示している。以上の実験で、H-Arg-Met-OH あるいはこれを含むペプチドが合成されれば、これに Pro-Tyr を附加することは、段階的に1個ずつ縮合させなくても、この dipeptide をアチド法で縮合させればよいことがわかった。なお Met は空気酸化をうけて、対応の sulfoxide になりやすい。したがってこれを防止するため、合成反応はすべて窒素気流中で行った。なお此の際 Boc 基の除去にトリフルオロ酢酸を使用した。この試薬に対してホルミル基は十分安定である事を N^ε-formyllysine で確認する事が出来た。

以上著者は、サルの β -MSH 合成上最も困難と目されていた部分、すなわち本分子中の中間区分の合成法について基礎的検討を行い、良好な方法を見出す事が出来た。一方もしここに得られた tetrapeptide (40) を Boc-Pro-Tyr-Arg-Met-NHNH₂ に導く事が出来れば、これをアチド法によってC端 N^ε-formylundecapeptide に直接結合させることが可能なのである。何故なら遊離の Arg を含むペプチドのアチド法については、2, 3の成功例があるからである。⁸⁵⁾ しかし上記 tetrapeptide (40) のエステルが合成出来ても、そのエステルを高濃度のヒドラジンにより相当するヒドラジドに導く際に、Arg のグアニド基はその塩基性に対し十分安定ではないのである。したがって著者は、この tetrapeptide を直接利用することなく、上記の基礎実験をもとに順次ペプチド鎖を延長する方法を採用した。

第五章 H-Pro-Tyr-Arg-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys(CHC)-Asp-CH(4~18)(50)の合成

著者は、前章までに H-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys(CHO)-Asp-OH(22) の合成に成功すると共に、Arg-Met を含むペプチドの合成法を基礎的に検討したが、それらをもとにして、サルの β -MSH の4位から18位までの pentadecapeptide, H-Pro-Tyr-Arg-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys(CHO)-Asp-OH(50) の合成を行った。

第一節 H-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys(CHO)-Asp-OH(8~18)(43)の合成

第三章第二節で得た N^{ϵ} -formyldecapeptide(22) に Glu を導入するにあたって、この γ -カルボキシル基の保護基は次の合成に残しておく必要はない。何故なら、C末端 Asp のカルボキシル基は、すでに遊離であるからである。したがって、本カルボキシル基の保護に、接触還元で除去出来るベンジル基(Bzl)を利用した。すなわち、Z-Glu(OBzl)-OH を利用し、これに対応の *p*-nitrophenyl ester, Z-Glu(OBzl)-ONp⁸⁶⁾ に導き図25に示すように反応を行った。

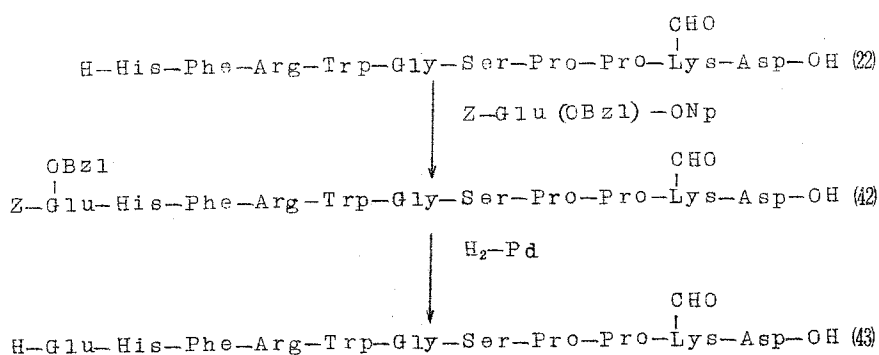


図25 C端 N^{ϵ} -formylundecapeptide(43)の合成

すなわち、Z-Glu(OBzl)-ONp と N^{ϵ} -formyldecapeptide(22) の塩酸塩を、DMF中、トリエチルアミンの共存下に反応させた。24時間後、薄層クロマトグラフィーで検

索すると、原料のスポットは完全に消失し、反応が満足に進行したことを認めた。ついで生成物、 $\text{Z-Glu(Obzl)-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys(CHO)-Asp-OH}$ (42) を 40% 酢酸に溶かし、40° にて、ナトリウムを触媒とする接触還元を行い、 $\text{H-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys(CHO)-Asp-OH}$ (43) の粗製品を得た。本品をピリジン酢酸緩衝液を用いて、CM-セルローズカラムクロマトグラフィーを行って精製した。280m μ における吸光度を測定して得られた溶出曲線は図 26 の如くである。

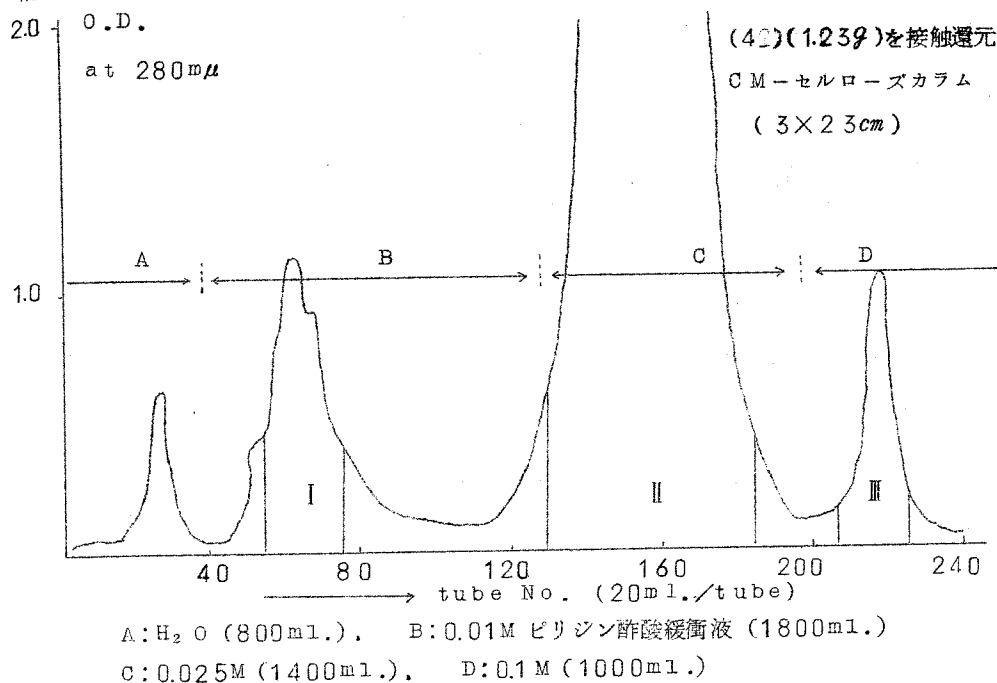


図 26 (43) の CM-セルローズカラムクロマトグラフィーによる精製

画分 I の検索は行わなかったが、0.025 M 流出部分 (画分 II) に目的とする N^{ϵ} -formylundecapeptide (43) が流出し、画分 III は、恐らく接触還元中にホルミル基が脱離した遊離の undecapeptide であろうと思われる。画分 II を集め、溶媒を溜去した後凍結乾燥を行って (43) の白色羽毛状粉末を平均 60% の収量で得る事が出来た。本品はペーパークロマトグラフィーおよびシリカゲル薄層クロマトグラフィーにおいて、それぞれニンヒドリン、Ehrlich、坂口および Pauly 反応陽性の単一スポットを示した。又ピリジン酢酸緩衝液 (pH 3.5 および 6.8) を溶媒とする濾紙電気泳動においても、ニンヒドリン反応陽性の単一スポットを示した。本品の酸加水分解物のアミノ酸分析を行った結果、構成アミノ酸比は理論値によく一致した。又

LAP消化物のアミノ酸比もほぼ理論値に近かったが、ただGluの回収率が多少低かった。これは弱アルカリ下におけるLAP消化中Gluがpyroglutamic acidに変化した事に起因する可能性が強いが、又一面著者の使用した粗製のLAP^{註2)}に原因があるのかもしれない。というのは、後記(第六章第二節)するように、市販の精製されたLAPを使用した際に、Gluの良好な回収率が認められた例があるからである。本アミノ酸分析の際、1モル当量のN^ε-formyllysineが検出されたが、この事はホルミル基がこれまでの操作において安定であった事を示している。本品の元素分析値は、1分子の酢酸と8分子の水のついた理論値に一致した。以上の事実より、ここに得られたN^ε-formylundecapeptide(43)は、L型アミノ酸からなる正しいアミノ酸組成をもったものであると判断する事が出来る。

註2

粗製leucine amino peptidase(LAP)は、Spackman等の方法⁶²⁾に従って調製した。即ち豚の腎臓のアセトン粉末を2回硫酸分画し、得られた粗製LAPを0.005M MgCl₂と0.005M Tris緩衝液を含むpH 8.0の水溶液としてフリーザー中に保存した。又使用前に、本溶液(1ml)をViskingのセロファン膜に入れ、水(1000ml)に対し、4°、48時間透析した。(凍結乾燥後の重量6.6 mg/ml)。

LAPによる加水分解は、Hofmann等の方法¹⁰⁰⁾に従って行った。即ち約1μモルのペプチドをLAPの水溶液(0.3ml)にて、37°、24時間処理した。なおheptapeptide以上のペプチドは上記条件下では完全水解されないで、さらにLAP(0.3ml)を追加し、37°、24時間処理した。

透析した粗製LAPでも自動消化からと考えられるアミノ酸が微量検出される。したがって、ペプチドのLAPによる消化物の回収率には多少の誤差は生ずるが、アミノ酸比には影響が認められなかったので、あえて補正值を使用しなかった。しかし唯Gluの回収率は約68%と低いが、これはundecapeptide(43)のみならず、後記するpentadecapeptide(50) octadecapeptide(1)にも認められる現象であり、又α-MSHの合成に際しても認められた⁷²⁾。この原因の一つとして、Gluのbenzyl esterが、undecapeptide(43)に残っている可能性があるが、これは、本品がカラムクロマトグラフィーにおいて、単一のピークを与えることより考え難い。たとえこの段階でbenzyl基が残っていても、後記する弗化水素処理で除去されるはずである。しかしこの処理を行った後のpentadecapeptide(50)およびoctadecapeptide(1)の酸加水解物のアミノ酸分析の結果、正しいGluの回収率が得られるが、LAP処理では、Gluの低い回収率が認められることは、この原因が粗製のLAP処理の間に生ずる可能性が強い。したがって、標品のGluを同条件下にLAP処理した後、アミノ酸分析を行ったが、その回収率は64%であった。したがってこの値をもとにして計算したGluの補正值を、実験の部には併記した。

第二節 H-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys (CHO)-Asp-OH (7~18) (45) の合成

前節において、N⁶-formylundecapeptide(43)を得たが、次にこのN端側に Met を導入しなければならない。すでに述べたように、アミノ保護基である benzyloxycarbonyl (Z) 基は、Metの硫黄の存在のため、もはや接触還元によって除去されない。そこでMetのα-アミノ基の保護基としては、接触還元以外の条件で除去されるものを選ばなければならない。この事を考慮すれば、Boc基、trityl基、o-nitrophenylsulphenyl (NPS) 基等が考えられるが、これらのうち trityl 基は立体障害という問題があり、NPS 基はTrpを含むペプチドには不適当⁸⁷⁾であるので、トリフルオロ酢酸で除去出来る Boc 基が適当と判断される。本試薬に対するホルミル基の安定性は、すでに前章で検討したとおりである。

そこで Boc-Met-ONp⁸⁸⁾ を用い図 27 に示すように反応を行った。

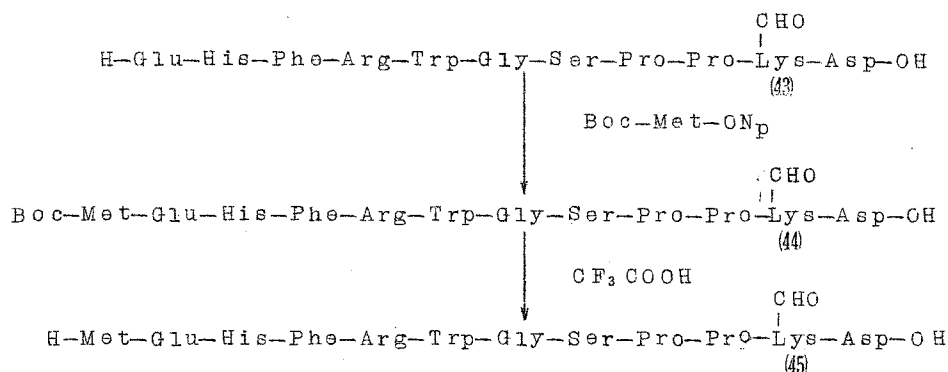


図27 C端N^ε-formyldodecapeptide (45)の合成

すなわち、窒素気流中DMFを溶媒として、Boc-Met-ONp と H-Glu-His-Phe-Arg-
-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys (CHO) -Asp-OH (43) のトリエチルアミン塩とを反応
させて、Boc-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys (CHO)
-Asp-OH (44) を得た。ついで(44)をトリフルオロ酢酸にて、室温で30分間処理してBoc 基を
除去し、乾燥エーテル(硫酸第一鉄処理して過酸を除去)を加える事により、H-Met-Glu-
His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys (CHO) -Asp-OH (45)の粗製品を粉
末として得た。本品を一度凍結乾燥した後、水にとかしアンモニア水で pH 4 に調節して、CM-

セルローズカラムにかけ、ピリジン酢酸緩衝液で溶出して精製した。その溶出曲線は図28に示す。

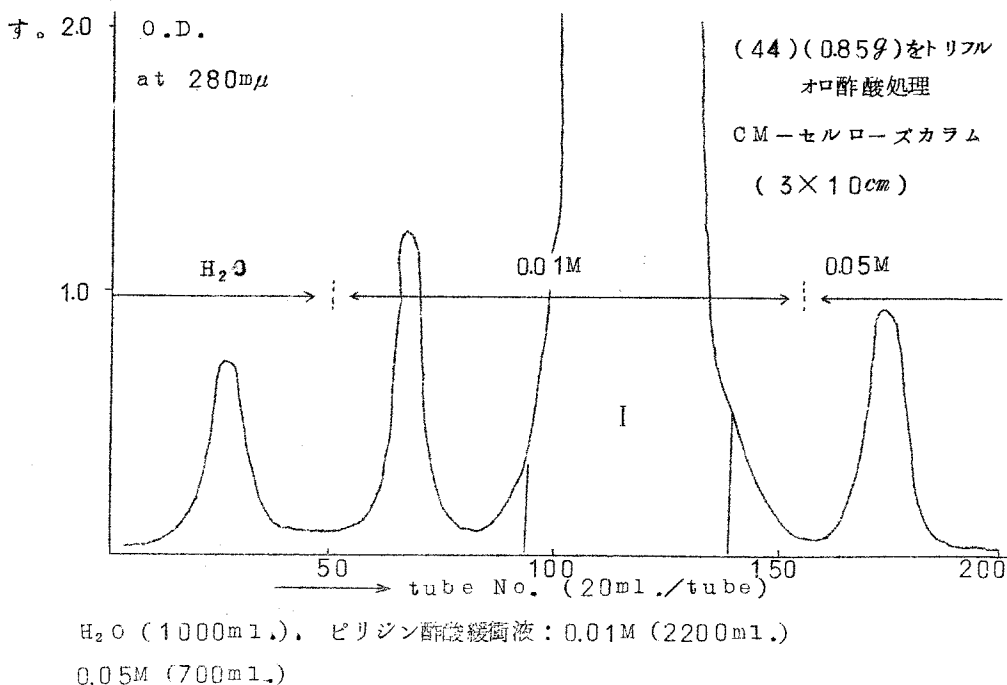


図28 (45)のCM-セルローズカラムクロマトグラフィーによる精製

画分Iを集め、溶媒を溜去後凍結乾燥して(45)を白色羽毛状粉末として56%の収量で得る事が出来た。本品はペーパークロマトグラフィーにおいて、ニンヒドリン、Ehrlich、メチオニン反応陽性の単一スポットを示した。又酸加水分解物のアミノ酸分析の結果、その構成アミノ酸比は理論値と一致した。又元素分析値は、1分子の酢酸と6分子の水のついた理論値に一致した。なおカラムクロマトグラフィーによる精製にあたって、画分Iの前後に小さいピークを認めたが、このいずれかは、Metがsulfoxideになったものと考えられるが精査しなかった。

第三節 H-Arg-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys(CHO)-Asp-OH (6~18) (48) の合成

次いで前節で得た N^ε-formyldecapeptide (45) に Arg 残基を導入して N^ε-formyltridecapeptide, H-Arg-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys(CHO)-Asp-OH (48) の合成を行った。

すでにしばしば記したように、この Arg 残基の導入反応は、本ホルモン合成上最も困難な点

であった。すでに第四章に記したモデルペプチド、 H-Arg-Met-OH ³⁷⁾の合成実験をもとにして、 $\text{Boc-Arg(NO}_2\text{)-OH}$ ⁸⁹⁾を利用して合成を進めた。

まず縮合の問題であるが、前記モデルペプチド、 $\text{Z-Arg(NO}_2\text{)-Met-OMe}$ ³³⁾等は混酸無水物法により合成された。しかし $\text{Z-Arg(NO}_2\text{)-OH}$ ⁹⁰⁾あるいは、 $\text{Boc-Arg(NO}_2\text{)-OH}$ ⁸⁹⁾の活性エステルも一部文献に知られているので、まずこれに検討を加えた。従来から、 Z- 又は $\text{Boc-Arg(NO}_2\text{)-OH}$ の活性エステル、たとえば *p*-nitrophenyl ester は、直ちに図29に示すような分子内のラクタムを形成し、ペプチド形成反応に使用されないものと考えられていた。^{91, 92)}これは、グアニド基に導入されたニトロ基がなお完全にグアニド基の塩基性を抑制していない事を示すものである。

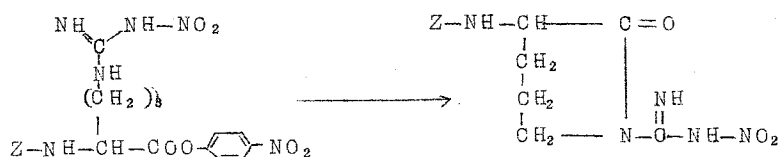


図29 $\text{Z-Arg(NO}_2\text{)-ONp}$ より導かれるラクタム

しかし、Bodanszky 等⁹³⁾および Kovacs 等⁹⁴⁾は、*p*-nitrophenyl ester のかわりに、pentachlorophenyl ester 又は 2,4-dinitrophenyl ester を使用すればこのラクタム形成の傾向を抑えて、 Z- あるいは $\text{Boc-Arg(NO}_2\text{)-}$ ペプチドを合成出来る事を示した。事実 Bodanszky 等⁹⁵⁾は、セクレチンの合成に際し、 Z- あるいは $\text{Boc-Arg(NO}_2\text{)-OH}$ の 2,4-dinitrophenyl ester を用い反応を行った。著者は、これらを参考にして、 $\text{Boc-Arg(NO}_2\text{)-OH}$ の pentachlorophenyl ester 又は 2,4-dinitrophenyl ester と (45) との縮合を試み、その反応の進行度を、シリカゲル薄層クロマトグラフィーを用いて追跡した。その結果、いずれの場合も反応はある程度進行するが途中で停止し、たとえ過剰の活性エステルを追加しても、反応を完結させる事が出来なかった。以上の結果は、これらの活性エステルもやはり自己の分子内環化の副反応を起すためであろうと思われる。そこで、 $\text{Boc-Arg(NO}_2\text{)-OH}$ と (45) とを、図30に示すように、モデルペプチドと同様混酸無水物法により縮合した。

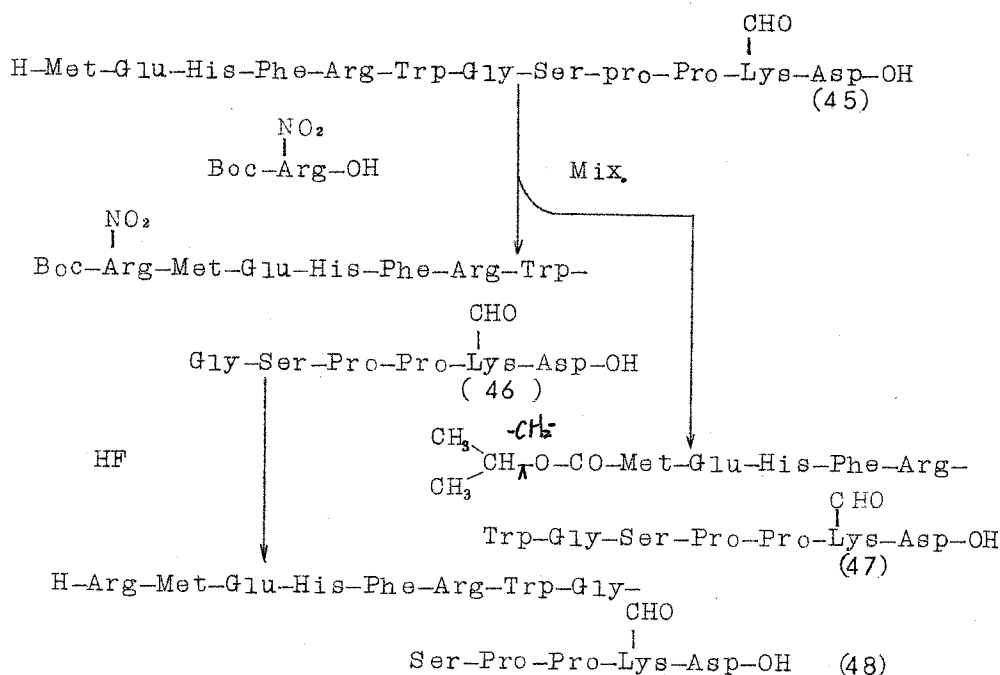


図30 c端 N^ε-formyltridecapeptide (48) の合成

すなわち、Boc-Arg(NO₂)-OH とクロル炭酸イソブチルから常法により混酸無水物を作り、(45)のトリエチルアミン塩と反応させた。反応液を薄層クロマトグラフィー (n-BuOH:Pyridine:AcOH:H₂O=15:10:3:12) で検索すると、原料のスポットは消失し、新たにRf0.57に Ehrlich 反応陽性、ニンヒドリン反応陰性のスポット (主成分) が現れた。しかしこれ以外にRf0.53にうすい Ehrlich 反応陽性、ニンヒドリン反応陰性のスポットを認めた。この反応混合物を粉末として得た後十分乾燥し、第四章第一節に記したと同様にして0°2時間弗化水素処理して、Boc基及びニトロ基を除去した。この際、17位Lysのε-アミノ基についたホルミル基が安定である事は、第四章第一節において記した予試験から予想される通りである。本品を上記したと同様の薄層クロマトグラフィーで検索するに、Rf0.53のスポットはそのまゝ残り、Rf0.57のスポットは消失してRf0.17にニンヒドリン、Ehrlich 反応共に陽性のスポットが現れた。此の際Rf0.53のスポットが依然ニンヒドリン反応陰性である事から、このRf0.53の物質は、混酸無水物法による縮合の際副成したurethan、すなわちN^α-CH₃CH(CH₃)₂O-CO-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys(CHO)-Asp-OH (47) であると推定される。この様なurethanの生成は、クロル炭酸イソブチルのかわりにクロル炭酸エチルを使用した際にもみられた。この点はモデル

ペプチド、Z-またはBoc-Arg(NO₂)-Met-OMeなどの小さいペプチドの合成反応と異なる点であり、比較的大きいアミノ成分を使用した際の混酸無水物法の欠点といえよう。この点はすでに、Albertson⁹⁶⁾、Stewart等⁹⁷⁾によって指摘されていたのであるが、十分の実験例が示されていたわけではない。著者の得た実験例は、彼等の見解を実証するとともに、混酸無水物法の一つの制約点を指摘したものと考える。

上記したように、Boc-Arg(NO₂)-OHの活性エステルを使用する反応が不成功に終わった以上、やはり本Arg残基は、副反応の生成を知りつつも、混酸無水物法によって(45)と結合させなければならなかった次第である。弗化水素処理によって得た混合物を精製するため、CM-セルローズカラムクロマトグラフィーを行った。この際ピリジン酢酸緩衝液では満足に分離する事が出来なかったが、溶出液を酢酸アンモニウム緩衝液にかえると、0.01M流出部分に大部分の副反応物、urethan(47)が流出し、目的物(48)は0.02Mから0.06M流出部分に広いピークとして流出した。後者の部分を集め、溶媒を溜去後、凍結乾燥をくり返して酢酸アンモニウムを除去し、(48)の白色羽毛状粉末を83%の収量で得る事が出来た。本品を薄層クロマトグラフィーで検索すると、少量のurethan(47)がなお混在している事がわかったが、このまゝ次の反応に用いた。事実この不純物は次の反応段階で完全に除去出来る事がわかったためである。

一方同定の目的で、本品の一部をとり、上と同様にして再クロマトグラフィーを行ったところ、0.01M流出部分(画分I)にurethan(47)、又0.02M流出部分(画分II)に目的物(48)を純粋に得る事が出来た。この溶出曲線は図31のごとくである。

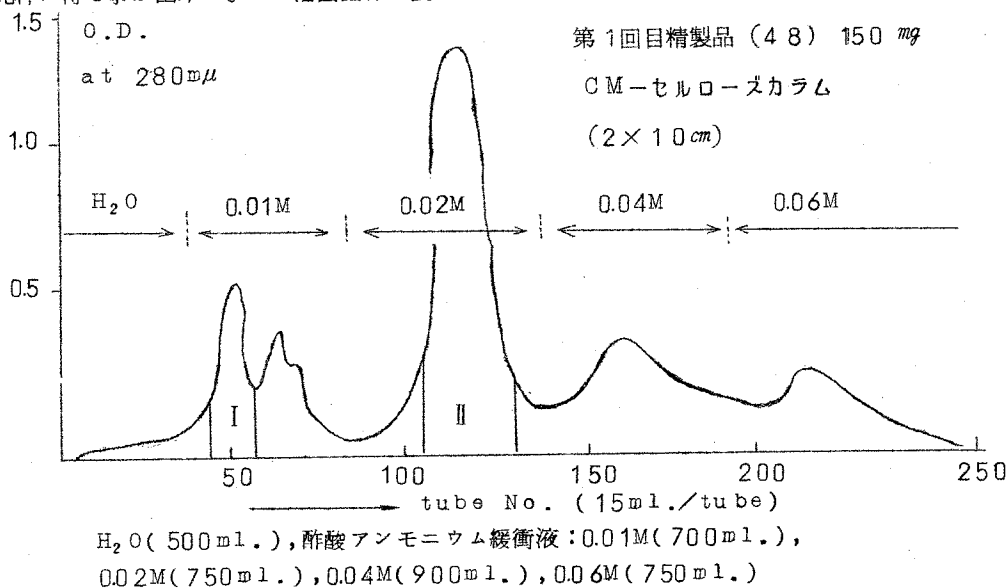


図31 (48)のCM-セルローズカラムクロマトグラフィーによる2回目の精製

本品は薄層クロマトグラフィ (n -BuOH:Pyridine:AcOH:H₂O=15:10:3:12) においてコンヒドリッ, Ehrlich, 坂口, ヌチオン反応陽性の単一スポットを示した。なお R_f 値は粗製品の時 0.17 とひくかったが, 精製の進むにつれて 0.44 と高い値になった。又本品の酸加水分解物のアミノ酸分析を行ったところ, 構成アミノ酸比は理論値とよく一致し, 又その元素分析値は, 2 分子の酢酸, 8 分子の水を有する理論値に一致した。以上の事実より, こゝに得られたペプチドは, 正しいアミノ酸組成を有する高度に精製せられた N^{ϵ} -formyltridecapeptide (48) であると判断出来る。このようにして著者は, 合成困難と考えられた Arg-Met を含む N^{ϵ} -formyltridecapeptide (48) を, モデル実験をそのまま生かすことによって合成する事が出来た。

第四節 H-Pro-Tyr-Arg-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys(CHO)-Asp-OH (4~18) (50) の合成

著者は第四章第二節において, モデルペプチド, H-Pro-Tyr-Arg-Met-OH (41) の合成法について基礎的に検討したが, その知見にもとづいて, 図 32 に示すように, Boc-Pro-Tyr-NHNH₂ (39) から導いたアチドと (48) のトリエチルアミン塩とを縮合後, トリフルオロ酢酸処理して H-Pro-Tyr-Arg-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys(CHO)-Asp-OH (50) を得た。

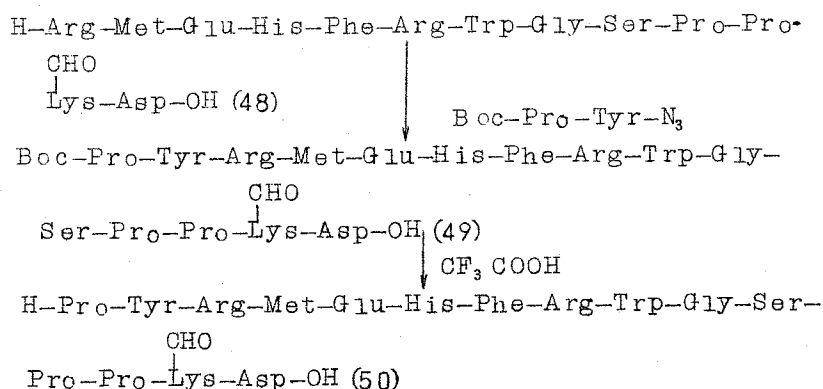
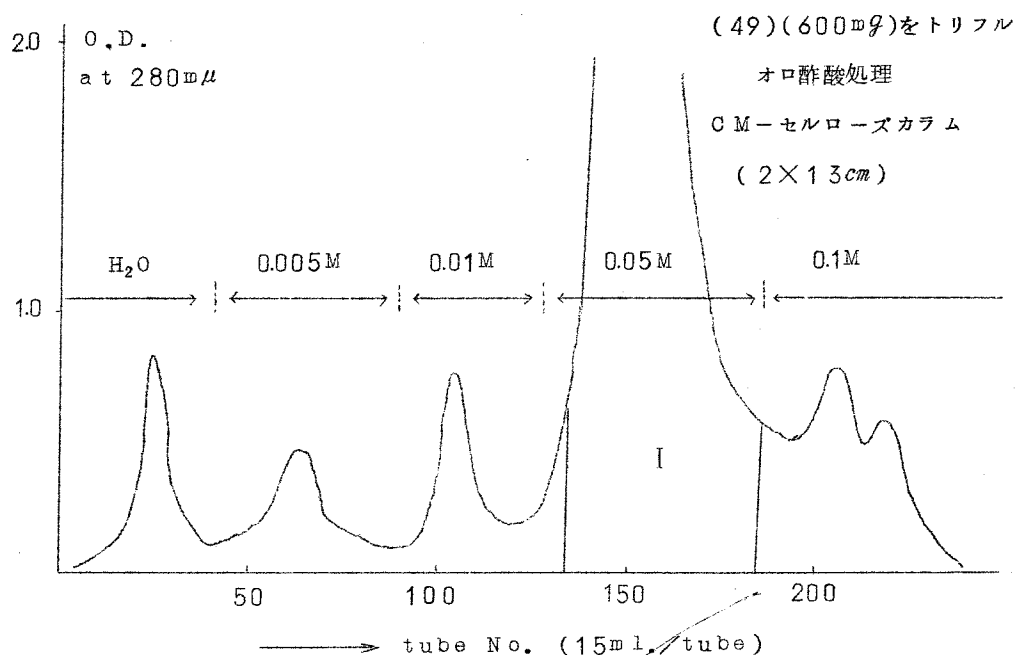


図 32 C 端 N^{ϵ} -formylpentadecapeptide (50) の合成

すなわち、第四章第二節における実験と同様にして、Boc-Pro-Tyr-NH₂ (39) を亜硝酸により相当するアチドに導き、(48) のトリエチルアミン塩と反応させると、上記モデル実験と同様反応は満足に進行し、反応液のコンヒドリッ呈色は、30 時間後完全に陰性となった。粉末として得た生成物を乾燥後、トリフルオロ酢酸処理してBoc 基を除去し、Amberlite CG4B (acetate form) 処理してトリフルオロ酢酸塩を酢酸塩に交換した。本粗製品をCM-セルローズカラムにかけ、酢酸アンモニウム緩衝液で溶出することによって精製した。その溶出曲線は図33に示すごとくである。



H₂O (600ml.), 酢酸アンモニウム緩衝液: 0.005M (750ml.),
0.01M (600ml.), 0.05M (800ml.), 0.1M (700ml)
図33 (50) のCM-セルローズカラムクロマトグラフィーによる精製

前章に述べた混酸無水物法による縮合の際の副成物、N^ε-formyldodecapeptide のurethan (47) が混在した原料 (48) を使用して反応した際、このurethan はCM-セルローズカラムクロマトグラフィーによる (50) の精製過程で、主として0.01M酢酸アンモニウム緩衝液流出区分に溶出され、目的物 (画分I) から都合よく分離された。画分Iを集め、凍結乾燥をくり返し (50) を白色羽毛状粉末として得た。本品は薄層クロマトグラフィーにおいて、コンヒドリッ、Ehrlich、メチオニン反応陽性の単一スポットを示した。特にコンヒ

ドリン反応で黄色を呈することは、この N^{ϵ} -formylpentadecapeptide (50) のN末端がProである事を裏書きするものである。又本品はピリジン酢酸緩衝液を溶媒とする戸紙電気泳動でも、ニンヒドリン、Ehrlich、メチオニン反応陽性の単一スポットを示した。本品の酸加水分解物のアミノ酸分析を行った結果、そのアミノ酸比は理論値に等しい値を示した。又本品を第三章第二節において記したと同様にしてLAP (粗製品)⁶²⁾ 消化したものをアミノ酸分析した結果、アミノ酸比は、Glu 以外はほぼ理論値に等しく、註2) 又この際 N^{ϵ} -formyllysine を1モル回収した。

この事実は本章において保護基の除去のために行ったトリフルオロ酢酸又は弗化水素処理においてホルミル基は安定であった事を証明している。又本品の元素分析値は、2分子の酢酸、9分子の水を有するペプチドの理論値には一致した。以上の実験事実から、本品は予想どおりのアミノ酸組成をもち、又その構成アミノ酸もすべてL配位をもった、高度に精製された N^{ϵ} -formylpentadecapeptide であると判断される。

以上著者は、図34に要約するように、2つのpentapeptide 区分を結合して出来た N^{ϵ} -formyldecapeptide (22) を延長して N^{ϵ} -formylpentadecapeptide (50) の段階に到達した。このにおいて、すでに合成の原理、結合様式の検討の章 (第二章第

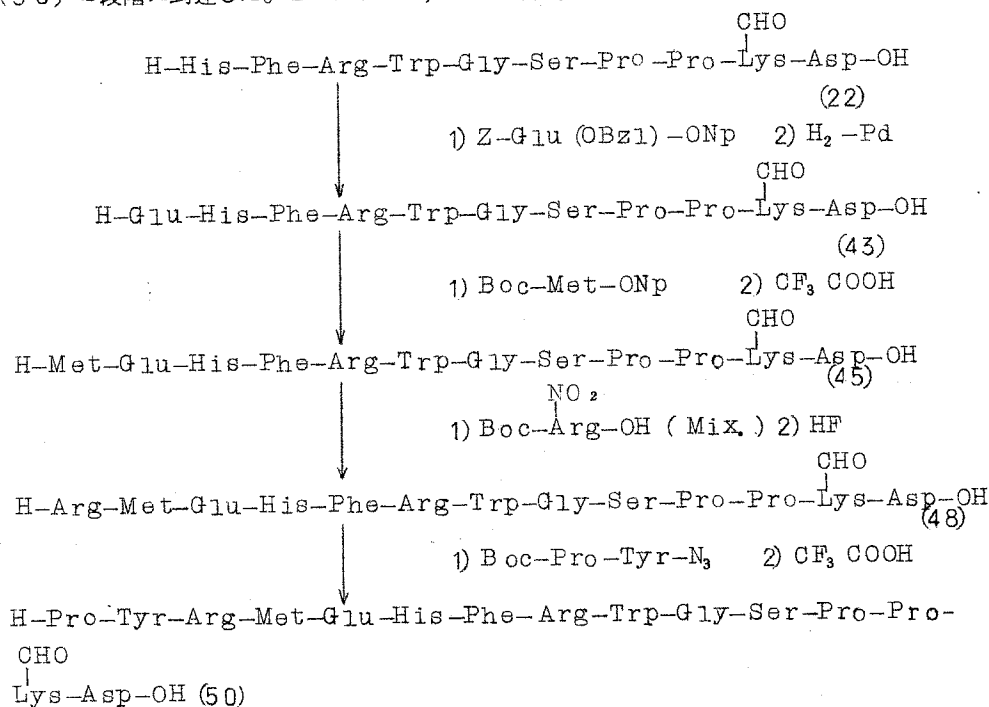


図34 C端 N^{ϵ} -formylpentadecapeptide (50) の合成

一節) に述べたように, サルの β -MSH中の2つのGly にはさまれた区分, すなわち
Pro-Tyr-Arg-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly (図5, 区分Ⅱ (4~13))
をC末端部Ser-Pro-Pro-Lys (CHO) -Asp (図5, 区分Ⅲ (14~18)) に結合した
形のN^ε-formylpentadecapeptide の合成をみるに至ったのである。

第六章 サルの β -Melanocyte-Stimulating Hormone (β -MSH) の全合成と合成ペ プチドの MSH 活性

第一節 Boc-Asp(OBu^t)-Glu(OBu^t)-Gly-OH (1~3)(57)の合成

著者はすでにサルの β -MSH の C 端 N^ε-formylpentadecapeptide, H-Pro-Tyr-Arg-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys(CHO)-Asp-OH (4~18) (50) の合成について述べたが, さらにこの N 端部に Asp-Glu-Gly というアミノ酸配列を有するペプチド区分を結合しなければならない。第二章に記したように, Boc-Asp(OBu^t)-Glu(OBu^t)-Gly-OH (57) と (50) とのペプチド区分結合を行うことを計画したので, 先ず図 35 に示すように (57) の合成を行った。

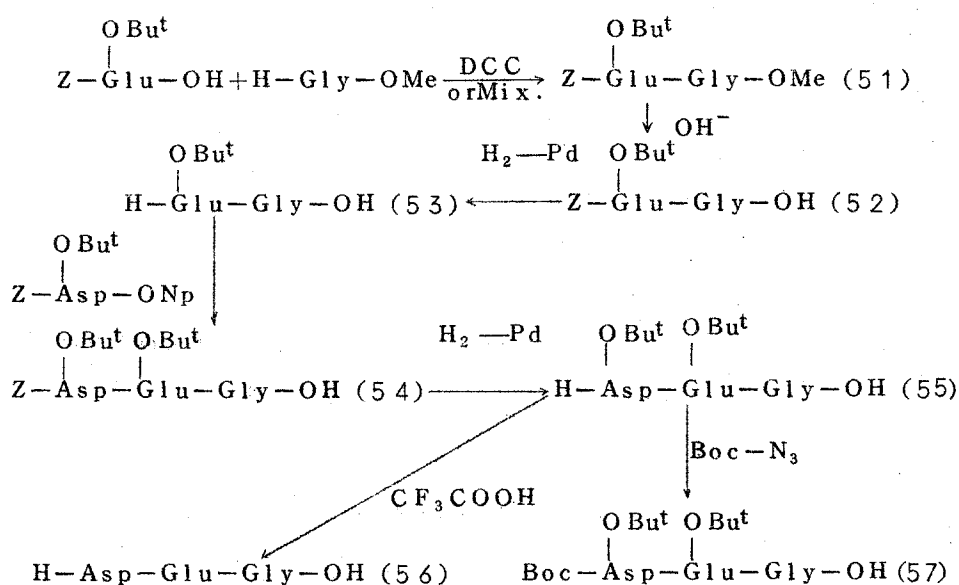


図35 Boc-Asp(OBu^t)-Glu(OBu^t)-Gly-OH (57) の合成

先ず $Z\text{-Glu}(\text{OBut})\text{-OH}$ と H-Gly-OMe を混酸無水物法あるいは DCC 法で縮合して $Z\text{-Glu}(\text{OBut})\text{-Gly-OMe}$ (51) を得、1 規定水酸化ナトリウムでそのエステルを鹼化して、 $Z\text{-Glu}(\text{OBut})\text{-Gly-OH}$ (52) を結晶状に得たが、さらに本品をその dicyclohexylamine 塩として同定した。つぎに (52) をメタノールに溶かし、パラジウムを触媒とする接触還元を行い、 $\text{H-Glu}(\text{OBut})\text{-Gly-OH}$ (53) を結晶状に得る事が出来た。本品と $Z\text{-Asp}(\text{OBut})\text{-ONp}$ を縮合して $Z\text{-Asp}(\text{OBut})\text{-Glu}(\text{OBut})\text{-Gly-OH}$ (54) の粗製品を得たが、本品は原料との分離が困難であったため、クロロホルムを溶媒とするシリカゲルカラムクロマトグラフィーを行い、(54) を純粋に結晶として得る事が出来た。本品を常法により接触還元して $\text{H-Asp}(\text{OBut})\text{-Glu}(\text{OBut})\text{-Gly-OH}$ (55) を結晶として得た。なお念のため本 tripeptide 誘導体 (55) をトリフルオロ酢酸で処理してすべての保護基を除去し、 H-Asp-Glu-Gly-OH (56) に導いた。本品の酸加水分解物および市販の精製 LAP⁶²⁾ による消化物のアミノ酸分析を行った結果、そのアミノ酸比は理論値によく一致した。

以上の事実より、各段階の合成反応は、ラセミ化を伴うことなく進行し、又この間 Asp 残基の α から β へのペプチド結合の転位⁴⁵⁾は起らなかったことがわかる。

つぎに、先に得た $\text{H-Asp}(\text{OBut})\text{-Glu}(\text{OBut})\text{-Gly-OH}$ (55) を $t\text{-butyl-azidoformate}$ と反応させ、 $\text{Boc-Asp}(\text{OBut})\text{-Glu}(\text{OBut})\text{-Gly-OH}$ (57) に導いた。本品は油状物質として得られたので、結晶性の dicyclohexylamine 塩として同定した。(57) のように保護基を持った、又分子中に呈色反応を示さないアミノ酸残基のみをもったペプチドの純度の検定には、シリカゲル薄層クロマトグラフィー後、沃度 (I_2) で呈色されるのが最良の方法であり、(57) の純度もこの方法で確認された。こゝに得られた (57) は直ちに $\text{N}^6\text{-formylpentadecapeptide}$ (50) と縮合させるべきであるが、これまでにしばしばふれた Asp の $\beta\text{-}t\text{-butyl ester}$ 部分のヒドラジンによる副反応を検討するため次の実験を行った。

まず (57) をジアゾメタンにより対応のメチルエステル (58) とし、これにヒドラジンを作用させると結晶が得られた。本品の元素分析値は、本 tripeptide (58) の中の 2 個のカルボキシル基がヒドラジドに変化したものの理論値によく合った。これまでに Glu の $\gamma\text{-}t\text{-butyl ester}$ の安定性を疑った文献はみあたらないので、これは Asp の $\beta\text{-}t\text{-butyl ester}$ が Gly の methyl ester と同時にヒドラジンによって対応のヒドラジドに導かれたことを予想させるに十分である。したがって本物質は $\text{Boc-Asp}(\text{NHNH}_2)\text{-Glu}(\text{OBut})\text{-Gly-NH-NH}_2$ (59) と考えられる。すでに記したように、かつて Schwyzer³²⁾ 等はウシの $\beta\text{-MSH}$ の合

成において、 $-\text{Asp}(\text{OBu}^t)-$ を含んだペプチドにヒドラジンを作用させて *methyl ester* のみをヒドラジドに変え、これを次の反応に使用したことを報告した。実際にはかなり注意して反応が行われたようであるが、しかし著者の実験結果をもとに考察すれば、彼等の合成法には無理があったと判断せざるを得ないのである。

第二節 サルの β -MSH(1) の全合成

著者は最終的に、C端 N^ϵ -formylpentadecapeptide (50) とN端 tripeptide 誘導体 (57) を縮合し、図36に示すようにしてサルの β -MSHの全合成を実施した。

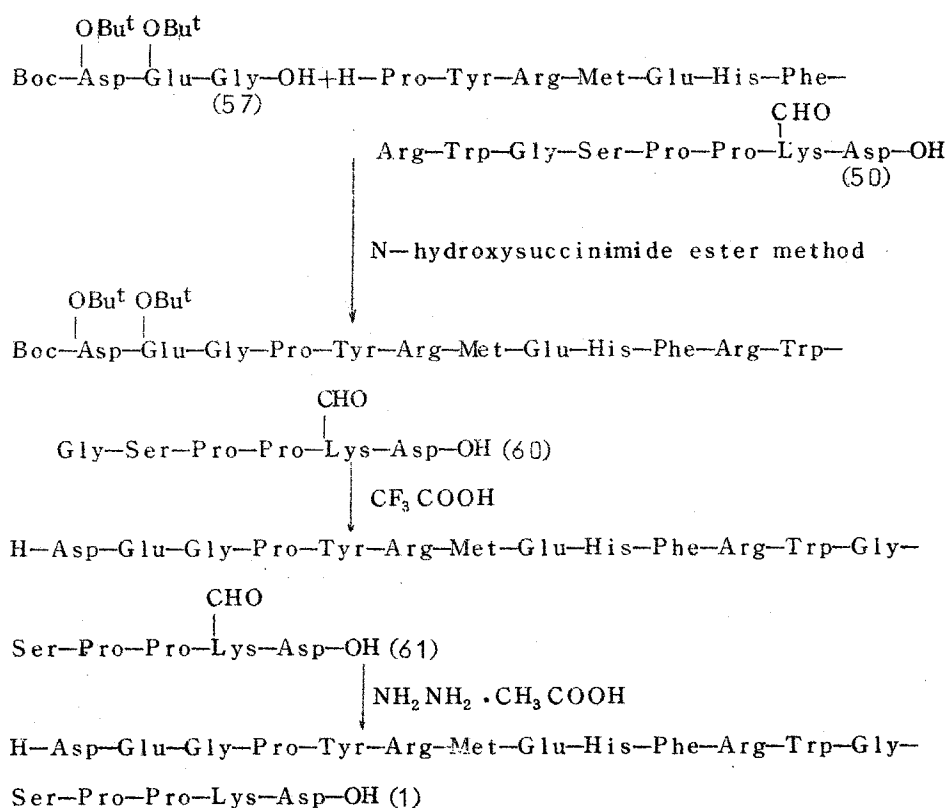
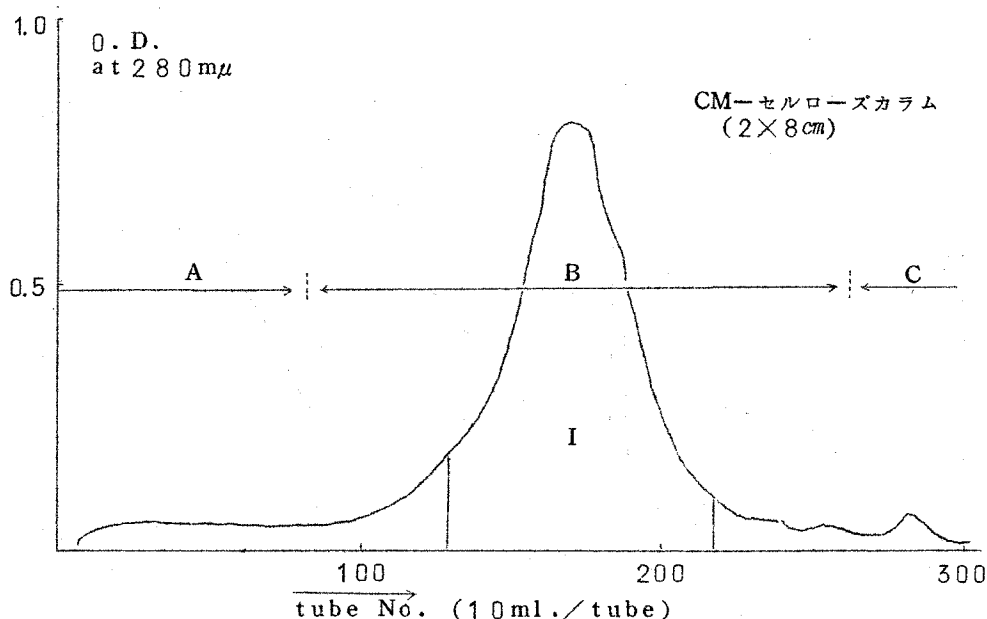


図36 サルの β -MSH(1) の全合成

まず(57)と(50)との縮合反応であるが、すでに第三章第二節に記したように、Pro がアミノ成分のN端にある場合に、混酸無水物法で直接酸成分を縮合しようとするとうrethan型の副反応物を生成しやすい事が知られている。そこで此の2区分の結合を活性エステル法によることにした。たまたま、*p*-nitrophenyl esterやpentachlorophenyl ester 以外に、N-hydroxysuccinimide esterが非常に優秀な活性エステルである事をAnderson⁵³⁾等が報告するに至ったので、本法を採用することとした。先ず(57)とN-hydroxysuccinimideをDCC法により結合して対応するN-hydroxysuccinimide esterに導いた。一般にacylpeptideをDCCで取扱うと、acylpeptide ureaが副生する事が知られているので、この際にも多少のureaが副生したかもしれない。しかしこの活性エステルを精製することなく、DMFを溶媒とし先に得たN^ε-formylpentadecapeptide(50)のトリエチルアミン塩と窒素気流中反応させた。反応進行度を薄層クロマトグラフィーで追跡すると、12時間後に原料のスポットはほとんど消失した。ここに得られた保護基をもったoctadecapeptide, Boc-Asp(OBu^t)-Glu(OBu^t)-Gly-Pro-Tyr-Arg-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys(CHO)-Asp-OH(60)からBoc基、*t*-butyl ester基を除去するため、本品をトリフルオロ酢酸で2時間処理後、硫酸第一鉄処理して過酸化物を除いた乾燥エーテルを加えて、粗製のN^ε-formyl-octadecapeptide, H-Asp-Glu-Gly-Pro-Tyr-Arg-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys(CHO)-Asp-OH(61)の白色沈澱を得た。本品を薄層クロマトグラフィーにて検索すると予期したより多いニンヒドリン陽性のスポットが検出された。ここに想起されることは、トリフルオロ酢酸による*t*-butyl esterの除去速度は、Boc基にくらべてかなりおそいことである。したがって、これら多くのスポットがあらわれる事は、分子中2個あった*t*-butyl esterの除去の不完全さに起因するものと考えられる。そこで上に得た粗製品(61)のトリフルオロ酢酸塩を水に溶かし一夜放置後薄層クロマトグラフィー(*n*-BuOH:Pyridine:AcOH:H₂O=15:10:3:12)で検索すると、Rf 0.44にニンヒドリン、Ehrlich反応共に陽性の主成分のスポットが見られ、それ以外にRf 0.17にニンヒドリン反応のみ陽性で他の試薬たとえばEhrlich反応等には陰性のスポットが現れたが、これは混在するN端tripeptide, H-Asp-Glu-Gly-OHに由来するものであろう。本粗製品をCM-セルローズカラムクロマトグラフィーで精製した。その溶出曲線は図37のごとくである。



A: H₂O (800 ml.), B: H₂O (300 ml.) と 0.01 M 酢酸アンモニウム緩衝液 (1700 ml.) からの linear gradient, C: 0.04 M 酢酸アンモニウム緩衝液 (350 ml.)

図37 [17N ϵ -formyllysine]-サル β -MSH (61) のCM-セルローズカラムクロマトグラフィーによる精製.

この精製操作において、混入するN端 tripeptide 区分はカラムに吸着される事なく水で容易に流出される。一方目的とするN ϵ -formyloctadecapeptide (61) は水と 0.01 M 酢酸アンモニウム緩衝液による linear gradient によって溶出された。画分 I から、凍結乾燥後 (61) の羽毛状粉末を高収率で得る事が出来た。本品はシリカゲル薄層クロマトグラフィー、および 0.1 M ピリジン酢酸緩衝液 (pH 3.5 および 6.8) を溶媒とする紙電気泳動において全く単一物質としての挙動を示した。本品を塩酸加水分解後アミノ酸分析した結果、Trp を除き他の構成アミノ酸比はほぼ理論値と一致した。又本品を Sanger 等の方法にならい、dinitrofluorobenzene にて DNP 化した後酸加水分解し、アミノ酸分析を行った結果 1 モルの Lys を回収した。さらに D₂O-CD₃COOD を溶媒として本品の NMR を測定した結果、図 38 に示すように、1.95 τ に Lys の ϵ -アミノ基についたホルミル (N-CHO) に由来する水素 1 個分のシグナルが、又 1.35 τ には His のイミダゾール核の水素のシグナルが現れた。これらの事は、17 位 Lys の ϵ -アミノ基がはまだホルミル基で保護されている事を明確に示すも

のである。

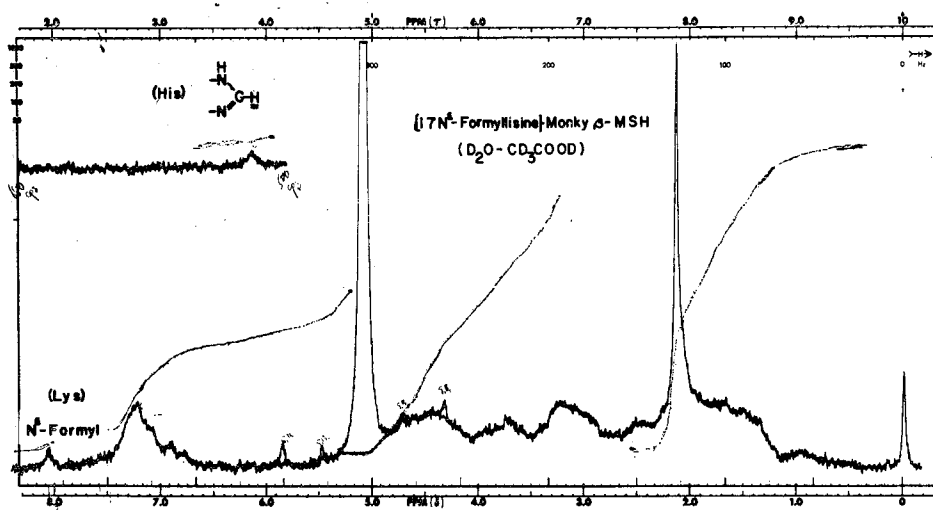


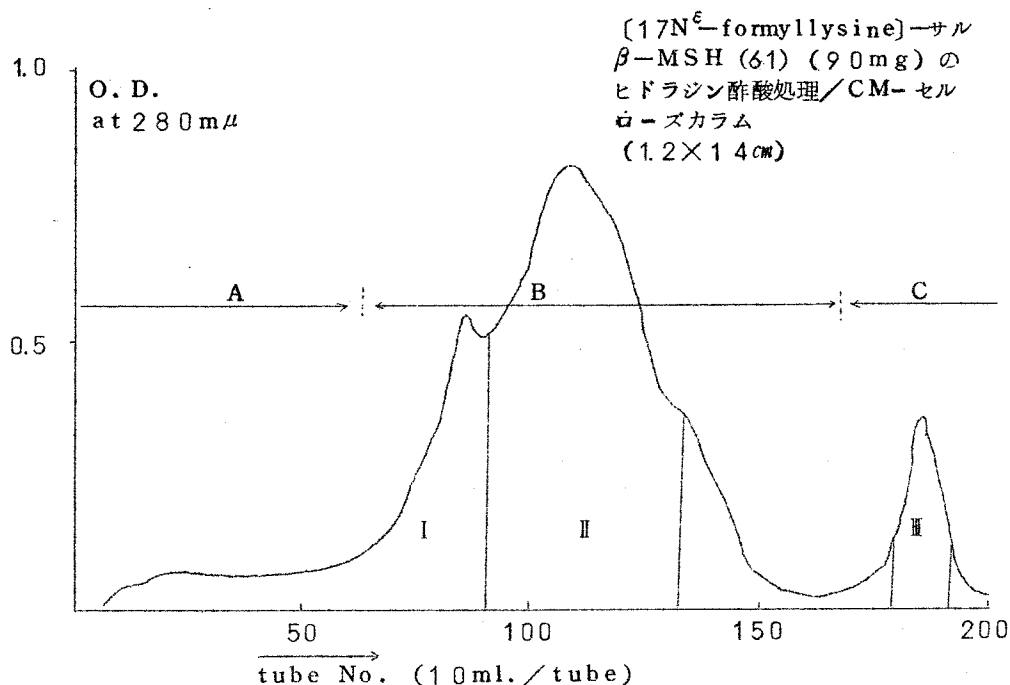
図38 [17N^ε-formyllysine]-サルβ-MSH (61) のNMRスペクトル

又本品の元素分析値は2分子の酢酸, 7分子の水を有するものの理論値によく一致した。

以上の諸事実より, こゝに得られたペプチドは, 目的とする純度の高い [17N^ε-formyllysine]-サルβ-MSH (61) であると判断する事が出来る。

つぎにサルのβ-MSHの合成最終段階である(61)の脱ホルミル化反応について述べる。すでに著者は第三章第三節において, H-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys(CHO)-Asp-OH (22) より脱ホルミル化して, H-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys-Asp-OH (23) を得た。この際15%ヒドラジン溶液を使用した, この反応はpH 6附近に調節したヒドラジン酢酸溶液でも良好に進行する事をみとめている。なおこの反応温度と時間の関係であるが, N^ε-formyllysine, (22)は約10%のヒドラジン酢酸中, 38°, 48時間で完全に脱ホルミル化される事から, 本N^ε-formyl-octadecapeptide (61)を同条件下, すなわち5%および10%ヒドラジン酢酸(pH 6.0)中38°, 48時間処理した所, 後記する2段階の精製の結果, いずれも, 約10%の目的物が得られ, かなりの原料を回収した。したがって, 本ペプチド(61)のホルミル基を除去するためには, モデルのN^ε-formyllysineおよびN^ε-formyldecapeptide に対して使用した条件より少しく強い条件を必要とするものと判断された。そのため著者は, この脱ホルミル

化の反応に、10%ヒドラジン酢酸中、沸騰水浴中にて3時間加熱するという条件を選んだ。この際Metの酸化を防止する目的で、反応容器中の空気を窒素で置換すると共に、少量のメルカプトエタノールを加えて反応した。本反応混合物を凍結乾燥後、CM-セルローズカラムクロマトグラフィーにかけ、水と0.01M酢酸アンモニウム緩衝液によるlinear gradientによって溶出精製したが、そのうちの1例を示せば図39のごとくである。

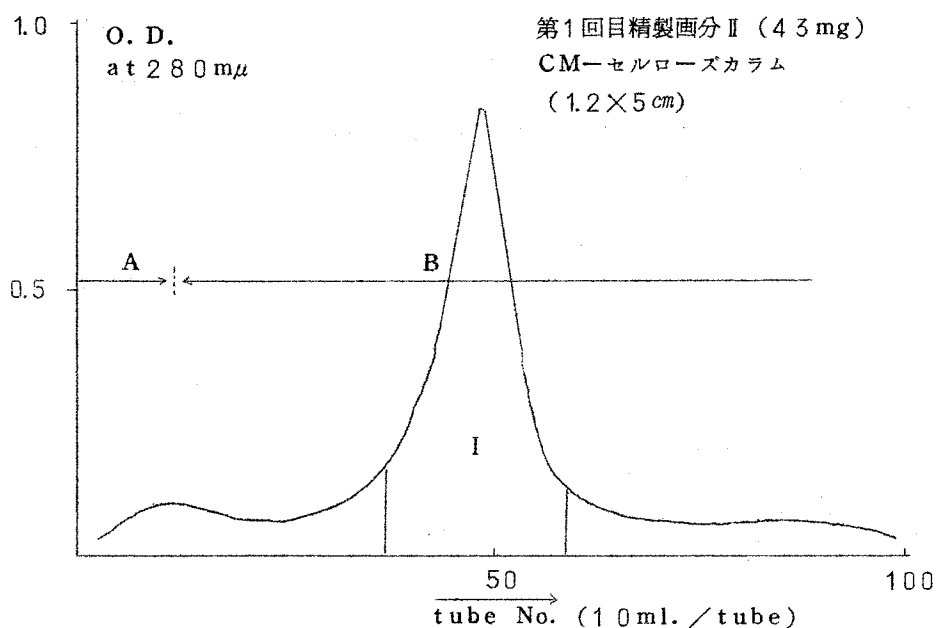


A: H₂O (600 ml.), B: H₂O (300 ml.) と 0.01 M 酢酸アンモニウム緩衝液 (650 ml.) からの linear gradient, C: 0.04 M 酢酸アンモニウム緩衝液 (350 ml.)

図39 サルのβ-MSH (1) の第1回目CM-セルローズカラムクロマトグラフィーによる精製

画分I, II, IIIをそれぞれ2回凍結乾燥した後、0.1 Mピリジン酢酸緩衝液 (pH 6.5) を溶媒とする戸紙電気泳動で検索すると、画分Iは原料である[17N ϵ -formyllysine]-サルβ-MSH (61) とそれより陰極側に少しく高い移動度を示す物質との混合物であり、後者は画分IIの主成分と同一であった。画分III中には画分IIの成分以外にさらに高い移動度を示す物質が混在していることを認めたが、この物質が何であるかは本区分自体が少量であったため精査しな

った。こゝに得られた画分Ⅱの主成分が、上記の電気泳動において原料より少しく高い移動度を示すことは、本成分が原料より少しく高い正電荷をになっていることであって、これは予想どおり本分子中のホルミル基が除去されて Lys の ϵ -アミノ基が遊離された結果と解釈される。しかし第1回目の精製操作で得られたこの区分中には、なお少量の原料が混在していることが認められたので、この画分ⅡをCMセルローズカラムにかけ、再クロマトグラフィーを行って精製した。こゝに図40に示す様な単一のピークが得られた。



A: H_2O (100 ml.), B: H_2O (200 ml.) と 0.01 M 酢酸アンモニウム緩衝液 (700 ml.) からの linear gradient

図40 サルの β -MSH (1) の第2回目CM-セルローズカラムクロマトグラフィーによる精製

第2回目のクロマトグラフィーによって得られた精製品は、薄層クロマトグラフィーおよび 0.1 M ピリジン酢酸緩衝液を溶媒とする 1 次電気泳動において 2 つの異った pH の条件下に、ニンヒドリン反応陽性の単一スポットを示した。また本品がメチオン試薬に陽性であることから、本分子中の Met 残基は sulfoxide に酸化されていない事がわかった。本品の酸加水分解物をアミノ酸分析した結果、そのアミノ酸比はサルの β -MSH に相当する octadecapeptide の理論値によく一致した。つぎに本品の LAP 消化を試みた。先ず Sigma Chemical Company

より購入した高度に精製されたLAPによる消化を行った後アミノ酸分析した結果、N端 tripeptide 構成アミノ酸、即ちAsp, Glu, Gly はほぼ1:1の比で回収されたが、次のPro残基以下のアミノ酸の回収率は悪かった。この様にProの位置で消化が止る現象は、精製LAP中にprolidaseが含まれていない事によるものであろう。⁶²⁾この事は第三章〔3.1.2〕に記したことからも予想される事であるが、少なくとも以上の実験結果から、N末端部Asp, Gluの側鎖カルボキシル基の保護基が、合成途上完全に除去されていること、又この2つの残基の結合が共に α 位の正常のペプチド結合で結ばれている事が判明した。次に豚の腎臓よりSpackmanの⁶²⁾方法に従い調製した粗製のLAPで消化した後アミノ酸分析を行ったところ、かなり長いペプチドであり、その完全水解が疑われたが、幸にして得られた構成アミノ酸比は理論値に近く、又N^ε-formyllysineでなく1モルのLysが検出された。この際Gluの回収率が悪かったが、これはおそらく第五章第一節に記した2つの原因のいずれかによるものであろう。^{註2)}以上のLAP処理の結果より、〔17N^ε-formyllysine〕-サルβ-MSH (61)のヒドラジン酢酸処理によって、AspおよびGlu残基のペプチド結合転位を伴うことなく、目的とするホルミル基のみが満足に除去された事がわかった。さらにこのホルミル基が除去された事は、本品のNMRスペクトルの結果からも支持された。すなわちD₂O-CD₃COOD中本品のNMRを測定すると図41に示すように、低磁場にはHisのイミダゾール核の水素に起因するシグナルが1.35τに現れるのみで、ホルミル基の水素に起因する1.95τのシグナルは全く消失していた。

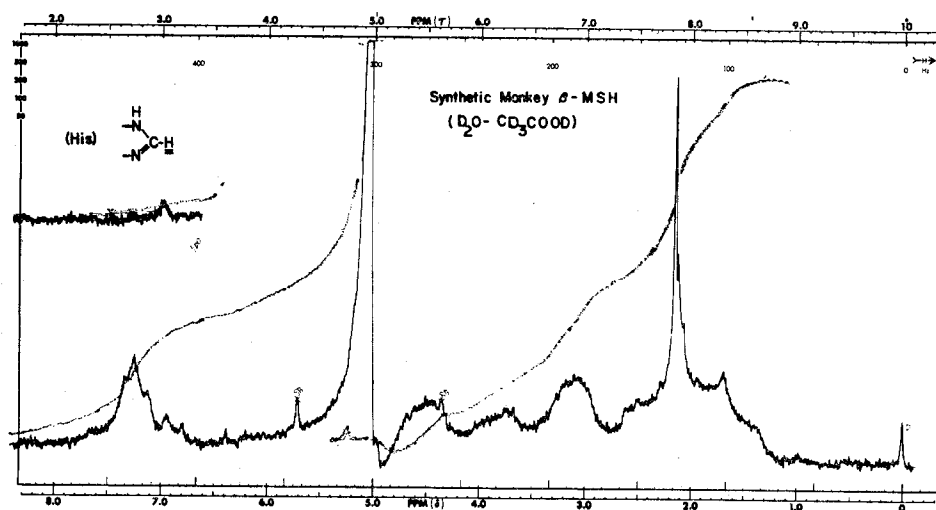


図41 合成サルβ-MSH (1) のNMRスペクトル

以上酸加水分解物およびLAP消化物のアミノ酸分析, さらにNMR測定の結果から, 本品は [17N^ε-formyllysine]-サルβ-MSH (61) からホルミル基だけが除去されたもの, 換言すればサルのβ-MSHに相当する全アミノ酸配列をもった octadecapeptide であると結論する事が出来る。したがって著者は, こゝにサルのβ-MSHを全合成する事が出来た次第である。

ひるがえって上記の全合成を, とくに今まで個々にふれなかったペプチド結合形成反応に際するラセミ化の点から考察したい。一般にウレタン型のアミノ保護基をもったアミノ酸を酸成分としてアミノ成分と結合する場合, 又, ペプチド区分結合をアチド法で行う場合にかぎってラセミ化を生じない事はペプチド合成化学上, 確立された事実である。そしてラセミ化は, アミノ酸でなくペプチドのカルボキシル基をアチド法以外の方法で活性化した場合に生ずる。すなわちペプチド間の区分結合にその危険が存するわけである。図42に要約したように, 著者は此の原則を忠実に守り, 区分結合点をラセミ化の危険のない Gly の点に選び, これに必要な区分, すなわち Asp-Glu-Gly (1~3), Ser-Pro-Pro-Lys(CHO)-Asp (14~18) をウレタン形アミノ保護基を採用して段階的に合成し, His-Phe-Arg-Trp-Gly (9~13) は別法によったが, いずれにせよ, それらをLAP処理してそれらの光学的純度を検定して後はじめて区分結合に使用した。さらに区分合成出来なかったサルのβ-MSHの中間部分のうち, Glu, Met, Arg の三者は段階的に縮合し, Pro-Tyr (4~5) はラセミ化の危険のないアチド法により導入した。

以上のような方法を採用して合成された octadecapeptide, すなわち合成サルβ-MSHの光学的純度は容易に予想出来ることであったが, 上記したLAPの実験はこれを再確認したものである。

特に, 全L体のペプチドを合成することは, 生物活性を検定する際にきわめて重要である。著者の採用した合成法は, この生物検定を前提とした場合, 構造と活性度との関係を論ずるに必要な合成中間ペプチド区分を組織的にしかも十分精製して得る事が出来たこととあいまって, きわめて合目的々であったと確信するものである。

[illegible]

図42 サルの β -MSHの全合成図

第三節 合成ペプチドのMSH活性

これまでに得られた合成ペプチドを、蛙 (*Rana pipiens*) の皮膚を用いて、第一章第一節に記したように、Sizume 等の方法に従って *in vitro* 法でMSH活性を測定した。その結果は表2に示すごとくである。

合 成 ペ プ チ ド	MSHU/g
H-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-OH (29)	0
Ac-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-OH (30) CHO	0
H-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys-Asp-OH (22)	1 x 10 ⁶
H-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys-Asp-OH (23) CHO	2.4 x 10 ⁶
H-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys-Asp-OH (43) CHO	6 x 10 ⁶
H-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys-Asp-OH (45)	1.9 x 10 ⁶
	2.3 x 10 ⁷
H-Arg-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys-Asp-OH (48) CHO	1.8 x 10 ⁸
H-Pro-Tyr-Arg-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys-Asp-OH (50)	2.2 x 10 ¹²
H-Asp-Glu-Gly-Pro-Tyr-Arg-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro- CHO	
Lys-Asp-OH (61)	2.0 x 10 ⁹
H-Asp-Glu-Gly-Pro-Tyr-Arg-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro- Lys-Asp-OH (1)	2.5 x 10 ¹⁰

表2 合成ペプチドのMSH活性度

際 N^{ϵ} -formyllysine を含んだペプチドは、すべて水に易溶であり、合成面だけでなく生物検定にも都合がよかったことを附記したい。

ひるがえって考察するに、ペプチド鎖の延長につれてMSH活性が増大し、ある一定の長さ、すなわち α -MSHの構造に対応した点で最高となり、それから逆に減少してゆく傾向は、ACTH関連ペプチドの合成研究にもみられた点である。ACTHの場合、此のMSH活性の減少につれて、逆に本来の副腎皮質刺激作用がペプチド鎖の延長とともに増大した。この際ペプチド鎖の延長方向は α -MSHのC末端側であったが、一方著者の合成したサルの β -MSHは、 α -MSHのN末端側へ延長した構造と考えることが出来る。こゝにも同一動物の脳下垂体に二種のMSH、すなわち α -MSH、 β -MSHが存在する事実とあいまって、 β -MSHの未知のしかし本質的な生理作用を予想せしめる根拠があるように思われるとともに、第一章第一節で記したような種々のMSH外作用の検索が行われている現状が想起され、その発展が期待されるのである。

結 語

以上著者は、Arg-Metという合成困難なアミノ酸配列を含むサルの β -MSHすなわちoctadecapeptideの合成を、 N^{ϵ} -formyllysine を利用しその緩和な除去条件を採用する事により、又新しい弗化水素法を採用する事によって完成した。その結果、本ホルモンのペプチド鎖の長さやMSH活性度との関係を明らかにする事が出来た。

思うに、サルの脳下垂体に示されたように、何故同じ動物が α および β という二種のMSHを持つのかという問題は、内分泌学上非常に興味あることといわねばならない。それに対してMSHの示す種々の生理作用が検討されている現状であるので、著者の合成品はこの目的に対しても将来役立つものと考えらる。

謝 辞

終りに臨み、本研究に際して終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜った恩師京都大学上尾庄次郎教授に心から感謝の意を表します。

また種々有益な御助言と直接の御指導を賜った京都大学矢島治明助教授、並びに実験の一部に協力された、川崎紘一修士、大島孝夫修士、木野村保彦修士、西村紀修士、南英男修士、河谷紘樹学士、

溝上業彬学士に感謝致します。

MSH活性の測定を担当された, Yale University, Dr. S. Lande に感謝致します。

アミノ酸分析を担当された京都大学医学部公衆衛生学教室金山淑子氏, 武田薬工株式会社 三野安, 藤野政彦両博士, 並びに塩野義製薬株式会社大塚英夫博士に感謝します。

元素分析を担当された京都大学元素分析センターの諸氏, 並びに塩野義製薬株式会社水上聡博士と元素分析室の諸氏に感謝します。

マスマスペクトルを測定して下さった加藤旭修士, NMRスペクトルを測定して下さった新宮徹朗博士, 大河美都子技官に感謝します。

実 験 の 部

融点 (m. p.) は未補正, 微量融点測定器 (柳本製作所製) で測定した。

旋光度は Rex 光電旋光計 NEP-2 型で測定した。

粗製 leucine amino peptidase (LAP) は Spackman⁶²⁾ 等の方法に準じて豚の腎臓より
調製し、精製 LAP は Sigma Chemical Company より購入し、いずれも Hofmann¹⁰⁰⁾
等の方法に従ってペプチドを処理した。

酸分解は 3 回蒸溜した定沸点塩酸 (b. p. 110°, 6 規定) で 110°, 18 時間加水分解した。

酸および LAP 分解物のアミノ酸組成は Moore¹⁰¹⁾ 等の方法に従って日立自動アミノ酸分析器 KL
A-2 型で測定した。

ペーパークロマトグラフィーは東洋丹紙 No. 51 を用い下降法で行った。Rf¹ は Partridge¹⁰²⁾
系の溶媒 (n-butanol : 酢酸 : 水 = 4 : 1 : 5) で展開した値を, Rf² は sec-butanol : 3% ammonia = 3 : 1¹⁰³⁾ の溶媒系で展開し Phe を 1.0 として計算した値 (xPhe) を示した。

薄層クロマトグラフィーは Kieselgel G nach Stahl (Merck) を用いて行った。
Rf³ は n-butanol : ピリジン : 酢酸 : 水 = 4 : 1 : 1 : 2 の溶媒系で展開した値を, Rf⁴
は n-butanol : ピリジン : 酢酸 : 水 = 15 : 10 : 3 : 12 の溶媒系で展開した値を示した。

カラムクロマトグラフィーは Bio Rad Corporation (Richmond, California) の CM-セルローズを用い, 東洋科学産業フラクションコレクター SF-200-A を用いて行った。

NMR は Varian Associates Recording Spectrometry (A-60) で測定した。

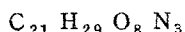
〔I〕 第三章に関する実験

H-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys(CHO)
-Asp-OH(22) および関連ペプチドの合成

〔I-A〕 Z-Ser-Pro-Pro-Lys(CHO)-Asp(OMe)₂(8) の合成

i) Z-Lys(CHO)-Asp(OMe)₂(2)

a) Z-Lys(CHO)-OH(10.83g) とトリエチルアミン(4.89ml) の無水テトラヒドロフラン溶液(75ml) を寒剤(氷-食塩)で-15°Cに冷却し攪拌しながらクロール炭酸エチル(33.6ml) を加え15分間攪拌し、この混合物をH-Asp(OMe)₂(hydrochloride(7.52g) とトリエチルアミン(4.9ml)より)の冷ジメチルアミノホルムアルデヒド(DMF)溶液(25ml) に加え2時間半攪拌した。反応終了後減圧下溶媒を溜去し、水(10ml) とエーテル(50ml) を加え生ずる沈澱を濾取し、10%クエン酸、5%アンモニア水でそれぞれ5回洗い、さらに水洗して乾燥、酢酸エチルより再結晶した。収量10.36g(65%)、m.p. 141~143°, $[\alpha]_D^{27} -11.3^\circ$ (C=0.7, MeOH)



理論値: C, 55.9; H, 6.5; N, 9.3

実験値: C, 55.8; H, 6.7; N, 9.3

b) Z-Lys(CHO)-OH(10.4g) とH-Asp(OMe)₂(7.2g) (hydrochloride(7.2g) とトリエチルアミン(4.9ml)より)をDMF(20ml) に溶かし寒剤で冷却しながらDCC(8.4g)を加え、同温度で30分間攪拌しさらに一夜攪拌を続けた。生じた尿素を濾去後濾液を減圧にて濃縮し残渣にエーテルを加え生じた白色沈澱を濾取し10%クエン酸、5%アンモニア水、水で順次5回ずつ洗い濾取し乾燥した。収量11.7g(74%)、m.p. 142~143°, 混酸無水物法で得た標品と混融するに融点降下を示さなかった。

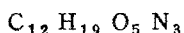
ii) H-Lys(CHO)-Asp(OMe)₂·HCl(3)

Z-Lys(CHO)-Asp(OMe)₂(5.67g)を85%水性メタノールに溶かし、氷酢酸(1.8ml)を加えた後パラジウムを触媒する接触還元を行った。パラジウムを濾去後濾液を濃縮し残渣を冷1規定塩酸(12.6ml)に溶かし凍結乾燥を行い油状物質を得た。収量5.80g(100%)、 $[\alpha]_D^{20} +12.6^\circ$ (C=1.0, MeOH), Rf¹ 0.65 ニンヒドリン反応陽性の単一

スポットを示した。

iii) H-Lys (CHO) - Asp (OMe)₂ のジケトピペラジン (4)

Z-Lys (CHO) - Asp (OMe)₂ (2.26 g) を 85% 水性メタノール (36 ml) に溶かし酢酸 (0.90 ml) を加えパラジウムを触媒とする接触還元を行い、パラジウムを除去後母液を減圧濃縮し残渣を無水ベンゼンに溶かして減圧下ベンゼンを溜去した。この操作を5回繰返して白色結晶を得た。無水メタノールと無水エーテルより再結晶した。収量 1.15 g (81%), m. p. 179~180°



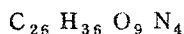
理論値: C, 50.5; H, 6.9; N, 14.7

実験値: C, 50.3; H, 6.8; N, 14.6

Mass: 親ピーク (M^+) m/e 285

iv) Z-Pro-Lys (CHO) - Asp (OMe)₂ (5)

Z-Pro-OH (2.92 g) と H-Lys (CHO) - Asp (OMe)₂ (hydrochloride) (5.80 g) とトリエチルアミン (1.8 ml) よりを混酸無水物法により常法に従って縮合し、生成物を酢酸エチルで抽出し、酢酸エチル層を 10% クエン酸、5% アンモニア水続いて水で洗い Na₂SO₄ 上で乾燥後溶媒を減圧下溜法し生ずるゲル状物質を酢酸エチルより再結晶した。収量 4.26 g (64%), m. p. 133~135°, $[\alpha]_D^{27} -5.5.2^\circ$ (C=0.8, MeOH) 酸加水分解物のアミノ酸比: Pro 1.03 Lys 1.00 Asp 0.98 (回収率 94%)



理論値: C, 56.9; H, 6.6; N, 10.2

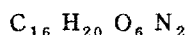
実験値: C, 57.0; H, 6.9; N, 9.9

v) H-Pro-Lys (CHO) - Asp (OMe)₂ · HCl (6)

Z-Pro-Lys (CHO) - Asp (OMe)₂ (0.57 g) をメタノール (20 ml) に溶かし 27% 酢酸 (0.7 ml) を加えパラジウムを触媒とする接触還元を行い塩酸塩にした後、凍結乾燥して油状物質を得た。収量 0.47 g (100%), $[\alpha]_D^{27} -35.6^\circ$ (C=0.7, MeOH), Rf¹ 0.65 ニンヒドリン反応陽性の単一スポットを示した。

vi) Z-Ser-Pro-OH (7)

この操作はすべて低温室(4°C)で行った。Z-Ser-NHNH₂ (1.012 g)に冷時塩酸の存在下亜硝酸ナトリウム (2.76 g) を作用させて調製したZ-Ser-N₃の冷エーテル溶液をPro (6.90 g) とトリエチルアミン (8.3 ml) を含む水溶液 (30 ml) に加え攪拌した。48時間後水層をエーテル層より分離し、エーテル層よりさらに5%アンモニア水で抽出し、水層と5%アンモニア水を合し、6規定塩酸で酸性にし生ずる油状物質を酢酸エチルで抽出し、常法により溶媒を溜去した。酢酸エチルより再結晶し白色結晶を得た。収量9.00 g (67%), m.p. 107~109°, $[\alpha]_D^{27} -7.0.2^\circ$ (C=0.7, MeOH)



理論値: C, 57.1; H, 6.0; N, 8.3

実験値: C, 56.9; H, 6.2; N, 8.1

vii) Z-Ser-Pro-Pro-Lys(CHO)-Asp(OMe)₂ (8)

Z-Ser-Pro-OH (336 mg) とH-Pro-Lys(CHO)-Asp(OMe)₂ (hydrochloride) (470 mg) とトリエチルアミン (0.14 ml) より) を混酸無水物法で常法により縮合して油状物質を得た。収量250 mg (34%), $[\alpha]_D^{15} -7.4.1^\circ$ (C=0.9, MeOH) 酸加水分解物のアミノ酸比: Ser 0.76 Pro 1.74 Lys 1.04 Asp 1.00 (回収率83%)

viii) Z-Ser-Pro-Pro-Lys(CHO)-Asp(OMe)₂ (8) の酸, アルカリ処理

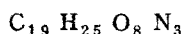
a) pentapeptide ester (8) (10 mg) をメタノール (0.2 ml) に溶かし1規定水酸化ナトリウム (0.1 ml) を加え, 0°C, 40分間放置後酢酸で中和した。この溶液をPartridge系のペーパークロマトグラフィーで検索すると, Rf 0.17 にセリンに相当するニンヒドリン反応陽性のスポット, Rf 0.22 にニンヒドリン反応で黄色を呈するスポットが現れた。

b) pentapeptide ester (8) (10 mg) を0.5規定塩酸に懸濁させ, 沸騰水浴中で30分間加熱後, Partridge系のペーパークロマトグラフィーで検索するとRf 0.22, 0.32, 0.64にニンヒドリン反応陽性のスポットが現れた。

〔I-B〕 H-Ser-Pro-Pro-Lys(CHO)-Asp-OH(19)の合成

i) Z-Lys(CHO)-Asp-OH(9)

Z-Lys(CHO)-Asp(OMe)₂ (15.1 g)をメタノール(40 ml)に溶かし1規定水酸化ナトリウム(136 ml)を加え20℃,45分間攪拌した。反応終了後酢酸で中和しメタノールを減圧下溜去し,水層を酢酸エチルで洗い,水層を濃縮後冷却下1規定塩酸でpH4にし冷蔵庫に一夜放置し生ずる白色結晶をろ取。10%クエン酸,続いて水で洗ってメタノールと酢酸エチルより再結晶した。収量1.103 g(78%), m.p. 154~156°, $[\alpha]_D^{20} +0.7^\circ$ (C=0.6, MeOH)

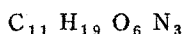


理論値: C, 53.9; H, 6.0; N, 9.9

実験値: C, 53.6; H, 6.3; N, 9.7

ii) H-Lys(CHO)-Asp-OH(10)

Z-Lys(CHO)-Asp-OH(9.3 g)を80%水性メタノール(50 ml)に溶かし氷酢酸(4.2 ml)を加えパラジウムを触媒とする接触還元を行い,反応終了後触媒をろ去し濾液を減圧下に濃縮し,残渣にエタノール(50 ml)を加え白色結晶を得た。水とエタノールより再結晶を行った。収量5.8 g(91%), m.p. 173~176°, $[\alpha]_D^{15} +24.0^\circ$ (C=1.1, H₂O), Rf¹ 0.21, Rf² 0.22×Phe ニンヒドリン反応陽性の単一スポットを示した。

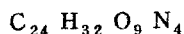


理論値: C, 45.7; H, 6.6; N, 14.5

実験値: C, 46.0; H, 6.8; N, 14.2

iii) Z-Pro-Lys(CHO)-Asp-OH(11)

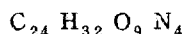
a) Z-Pro-OH(0.36 g)とトリエチルアミン(0.22 ml)を無水テトラヒドロフラン(5 ml)に溶解し,寒剤(氷-食塩)で冷却(-15℃)し,クロル炭酸エチル(0.15 ml)を加え20分間攪拌,この反応液をH-Lys(CHO)-Asp-OH(0.45 g)とトリエチルアミン(0.43 ml)を含む水(3 ml)とDMF(3 ml)の混液に加え,0℃にて30分間さらに室温で2時間攪拌した。溶媒を減圧下溜去後残渣を水に溶かし水層を酢酸エチルで洗い,氷冷下1規定塩酸でpH4にし,生ずる物質を酢酸エチルで抽出し飽和食塩水で洗滌後Na₂SO₄で乾燥,溶媒を溜去後残渣をメタノールと酢酸エチルより再結晶して白色粉末を得た。収量0.30 g(50%), m.p. 170~173°, $[\alpha]_D^{25} -43.4^\circ$ (C=0.9, MeOH)



理論値：C, 55.4 ; H, 6.2 ; N, 10.8

実験値：C, 55.4 ; H, 6.4 ; N, 10.5

b) H-Lys (CHO) - Asp-OH (6.39 g) とトリエチルアミン (6.2 ml) を含む 75%水性ジオキサン溶液 (160 ml) に Z-Pro-ONp (7.84 g) を加え 24 時間攪拌を続けた。減圧下溶媒を溜去し析出したパラニトロフェノールを酢酸エチル (10 ml) に溶かし、この溶液を冷却下 1 規定塩酸で pH 4 にし冷蔵庫に一夜放置後生じた結晶を濾取した。結晶を 10 %クエン酸、水で洗いメタノールと酢酸エチルより再結晶した。収量 9.03 g (93%), m. p. 178~180°, $[\alpha]_D^{25} -48.6^\circ$ (C=1.0, MeOH)



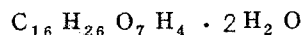
理論値：C, 55.4 ; H, 6.2 ; N, 10.8

実験値：C, 55.3 ; H, 6.3 ; N, 10.5

c) Z-Pro-Lys (CHO) - Asp (OMe)₂ (0.28 g) をメタノール (2 ml) に溶かし 1 規定水酸化ナトリウム (3 ml) を加え、20°C 40 分間攪拌して 10%クエン酸で中和しメタノールを溜去後水層を酢酸エチルで洗滌し、氷冷下 1 規定塩酸で pH 4 にし酢酸エチルで抽出して飽和食塩水で洗い Na₂SO₄ で乾燥。溶媒を溜去後残渣をメタノールと酢酸エチルより再結晶した。収量 0.03 g (10%), m. p. 168~170°

iv) H-Pro-Lys (CHO) - Asp-OH (12)

Z-Pro-Lys (CHO) - Asp-OH (7.92 g) を 85%水性メタノール (47 ml) に溶かし氷酢酸 (3.3 ml) を加えパラジウムを触媒とする接触還元を行い、反応終了後パラジウムを濾去し濾液を減圧下濃縮し、残渣にエタノール (50 ml) を加え生ずるゲル状物質を濾取。水とエタノールより再沈殿を行った。収量 5.64 g (80%), m. p. 143° (decomp.), $[\alpha]_D^{25} -42.1^\circ$ (C=1.0, H₂O), Rf¹ 0.21, Rf² 0.25 × Phe ニンヒドリン反応陽性の単一スポットを示した。

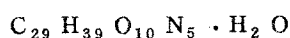


理論値：C, 46.6 ; H, 7.5 ; N, 12.5

実験値：C, 46.4 ; H, 7.6 ; N, 12.9

v) Z-Pro-Pro-Lys (CHO)-Asp-OH (13) とその dicyclohexylamine 塩

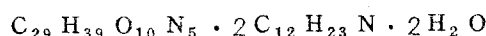
H-Pro-Lys (CHO)-Asp-OH (5.30 g) とトリエチルアミン (3.8 ml) を含む 50% 水性ジオキサン溶液 (47 ml) に Z-Pro-ONp (7.1 g) のジオキサン溶液 (40 ml) を加え室温で 2 日間攪拌。溶媒を減圧下溜去し残渣を水に溶かし酢酸で中和して酢酸エチルで洗滌。水層を濃縮し 1 規定塩酸で pH 4 にし, *n*-ブタノール抽出して水洗後減圧下溶媒を溜去した。残渣に酢酸エチルを加え生ずる無晶形の物質を傾瀉して取り出し乾燥。収量 7.3 g (90%)
 $[\alpha]_D^{21} - 9.63^\circ$ (C=1.0, MeOH), 酸加水分解物のアミノ酸比: Pro 2.02 Lys 0.86 Asp 1.00 (回収率 92%)



理論値: C, 54.8; H, 6.5; N, 11.0

実験値: C, 54.9; H, 7.0; N, 11.1

Z-Pro-Pro-Lys (CHO)-Asp-OH (0.16 g) のメタノール溶液 (1 ml) に dicyclohexylamine (0.11 ml) を加え, メタノールを溜去後生ずるゲル状物質をメタノールとアセトンより再結晶した。収量 0.20 g (80%), m.p. 129° 崩解, 230° 融解,
 $[\alpha]_D^{18} - 44.2^\circ$ (C=0.6, MeOH).

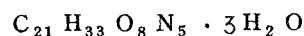


理論値: C, 62.6; H, 8.8; N, 9.7

実験値: C, 62.8; H, 8.9; N, 9.9

vi) H-Pro-Pro-Lys (CHO)-Asp-OH (14)

Z-Pro-Pro-Lys (CHO)-Asp-OH (7.30 g) を 85% 水性メタノール (35 ml) に溶かし氷酢酸 (1.8 ml) を加えパラジウムを触媒とする接触還元を行った。反応終了後パラジウムを濾去し濾液を減圧下濃縮して, さらに凍結乾燥を行い白色粉末を得た。収量 4.9 g (86%), $[\alpha]_D^{24} - 109.5^\circ$ (C=0.9, H₂O), Rf¹ 0.30, Rf² 0.18 × Phe, ニンヒドリン反応陽性の単一スポットを示した。

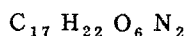


理論値: C, 46.9; H, 7.3; N, 13.0

実験値: C, 46.9; H, 6.9; N, 13.1

vii) Z-Ser-Pro-OMe (15)

Z-Ser-Pro-OH (1.00 g) のメタノール溶液 (5 ml) にジアゾメタンのエーテル溶液 (5 g のニトロソメチルウレアより調製) を加え 1 時間室温に放置し、過剰のジアゾメタンを酢酸で分解後減圧下溶媒を溜去し残渣をメタノールより再結晶した。収量 0.70 g (65%), m. p. 117~121°, $[\alpha]_D^{18} -68.2^\circ$ (C=0.9, Me OH)

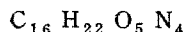


理論値: C, 58.3; H, 6.3; N, 8.0

実験値: C, 58.2; H, 6.6; N, 7.9

viii) Z-Ser-Pro-NHNH₂ (16)

Z-Ser-Pro-OMe (0.60 g) のメタノール溶液 (5 ml) に 80% ヒドラジンヒドレート (0.6 ml) を加え室温にて一夜放置後、減圧下濃縮して生ずる結晶をメタノールより再結晶した。収量 0.49 g (79%), m. p. 137~141°, $[\alpha]_D^{24} -93.9^\circ$ (C=1.0, 40% Ac OH)

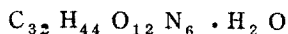


理論値: C, 54.8; H, 6.3; N, 16.0

実験値: C, 55.1; H, 6.5; N, 15.7

ix) Z-Ser-Pro-Pro-Lys(CHO)-Asp-OH (17)

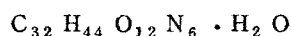
a) この反応操作はすべて低温室 (4°C) で行った。Z-Ser-NHNH₂ (1.50 g) に冷時塩酸の存在下亜硝酸ナトリウム (1.50 g) を作用させて調製した Z-Ser-N₃ の冷酢酸エチル溶液 (40 ml) を H-Pro-Pro-Lys(CHO)-Asp-OH (4.90 g) とトリエチルアミン (4.17 ml) を含む水溶液 (15 ml) に加えて攪拌した。24 時間後さらに Z-Ser-N₃ (2.80 g の Z-Ser-NHNH₂ より調製) を加え 24 時間反応後分液して有機層から 5% アンモニア水で抽出し水層と合し、水層を酢酸エチルで洗滌。水層を酢酸で中和後減圧濃縮し氷冷下 1 規定塩酸で pH 4 にして生ずる油状物質を n-ブタノール抽出し水洗後減圧下溶媒を溜去した。残渣に酢酸エチルを加え白色粉末を得た。n-ブタノールと酢酸エチルより再沈殿を行った。収量 5.52 g (75%), $[\alpha]_D^{22} -115.0^\circ$ (C=0.8, Me OH), 酸加水分解物のアミノ酸比: Ser 0.91 Pro 1.87 Lys 1.01 Asp 1.00 (回収率 81%)



理論値: C, 53.1; H, 6.4; N, 11.6

実験値：C, 53.6; H, 7.1; N, 11.4

b) この反応操作はすべて低温室 (4℃) で行った。Z-Ser-Pro-NH₂ (0.42g) に冷時塩酸の存在下亜硝酸ナトリウム (0.08g) を作用させて調製した Z-Ser-Pro-N₃ の酢酸エチル溶液を H-Pro-Lys (CHO)-Asp-OH (0.30g) とトリエチルアミン (0.28ml) を含む水溶液に加え攪拌。24時間後さらに Z-Ser-Pro-N₃ (0.18g の Z-Ser-Pro-NH₂ より調製) を加え、24時間後酢酸エチル層より水層を分離し、有機層より5%アンモニア水で抽出し水層と合し、合した水層を酢酸エチルで洗滌後酢酸で中和し減圧濃縮。冷時1規定塩酸で pH 4 にし生ずる油状物質を *n*-ブタノール抽出し水洗後減圧下溶媒を溜去、残渣に酢酸エチルを加え白色粉末を得た。メタノールと酢酸エチルより再沈殿。収量 0.11g (16%), $[\alpha]_D^{22} -114.6^\circ$ (C=0.9, MeOH), 酸加水分解物のアミノ酸比: Ser 0.94 Pro 2.00 Lys 0.91 Asp 1.00 (回収率 76%)



理論値：C, 53.1; H, 6.4; N, 11.6

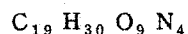
実験値：C, 52.9; H, 6.6; N, 11.7

c) Z-Ser-Pro-OH (7) と H-Pro-Lys (CHO)-Asp-OH (12) との混酸無水物法による縮合反応

EtOCO-Pro-Lys (CHO)-Asp-OH (18) の生成

Z-Ser-Pro-OH (1.04g) とトリ *n*-ブチルアミン (0.74ml) をジオキサン (7.5ml) とテトラヒドロフラン (6ml) に溶かし寒剤で -15° に冷やし攪拌しながらクロル炭酸エチル (0.30ml) を加え同温度で15分間攪拌を続け反応混合物を H-Pro-Lys (CHO)-Asp-OH (1.20g) とトリエチルアミン (0.86ml) を含む水 (4.5ml) とジオキサン (6ml) の溶液に加え 0°C で30分間、室温で2時間半攪拌。減圧下溶媒を溜去し冷却下1規定塩酸で pH 4 にし酢酸エチル (5ml) を加え冷蔵庫に放置し析出した白色結晶をメタノールと酢酸エチルより再結晶。収量 0.86g (61%), m.p. 195~198°, $[\alpha]_D^{22} -57.0^\circ$ (C=0.95, MeOH), 酸加水分解物のアミノ酸比: Pro 1.04 Lys 0.91 Asp 1.00 (回収率 90%)

NMR (D₂O) τ : 8.80 (3H, triplet, -CH₂-CH₃); 5.88 (2H, quartet, -CH₂-CH₃)



理論値：C, 49.8 ; H, 6.6 ; N, 12.2

実験値：C, 49.8 ; H, 6.8 ; N, 11.9

結晶を濾取した母液を酢酸エチルで洗滌後水層を n -ブタノール抽出し、減圧下溶媒を溜去し残渣に酢酸エチルを加え白色粉末を得た。酸加水分解物のアミノ酸比：Ser 0.40 Pro 1.34 Lys 0.94 Asp 1.00 , この事より本品は約40%のZ-Ser-Pro-Pro-Lys (CHO)-Asp-OHと60%のEtOCO-Pro-Lys (CHO)-Asp-OHの混合物であると考えられる。

X) H-Ser-Pro-Pro-Lys (CHO)-Asp-OH (19)

Z-Ser-Pro-Pro-Lys (CHO)-Asp-OH (0.99 g) をメタノール (20 ml) と水 (5 ml) の混液に溶かし氷酢酸 (0.5 ml) を加えパラジウムを触媒とする接触還元を行い、触媒を濾去後濾液を減圧濃縮しその後凍結乾燥して白色粉末を得た。収量 0.64 g (85.6%), $[\alpha]_D^{25} -126.6^\circ$ (C=0.9, H₂O), Rf¹ 0.31, Rf² 0.22 \times Phe, ニンヒドリン反応陽性の単一スポットを示した。酸加水分解物のアミノ酸比：Ser 0.97 Pro 2.01 Lys 1.00 Asp 1.06 (回収率86%), LAP (粗製品) 消化物のアミノ酸比：Ser 1.09 Pro 1.95 Lys (CHO) 1.00 Asp 0.84 (回収率88%)

C₂₄H₃₈O₁₀N₆ · 2H₂O

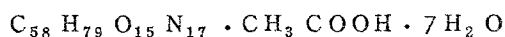
理論値：C, 47.5 ; H, 6.9 ; N, 13.9

実験値：C, 47.3 ; H, 7.0 ; N, 13.6

[I-C] H-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys (CHO)-Asp-OH (22)

Z-His-Phe-Arg (NO₂)-Trp-Gly-OH (0.58 g) とトリエチルアミン (0.14 ml) の無水DMF溶液 (3 ml) を寒剤で冷却、攪拌下クロル炭酸イソブチル (0.13 ml) を加え15分間攪拌し、反応混合物をH-Ser-Pro-Pro-Lys (CHO)-Asp-OH (0.37 g) とトリエチルアミン (0.19 ml) の75%水性DMF溶液 (4 ml) に加え0℃で30分間、室温にて2時間攪拌を続けた。減圧下溶媒を溜去し残渣に水を加え生ずる粉末を濾取した。収量 0.99 g。本粉末を50%酢酸 (25 ml) に溶かし、パラジウムを触媒とし40℃,

24時間接触還元を行った。反応液をPartridge系ペーパークロマトグラフィーで検索すると、 R_f 0.50, 0.27に2つのスポットを認めた。パラジウムを γ 去し γ 液を減圧下溜去し、残渣を凍結乾燥後水酸化カリウム上で乾燥し、300mlの水に溶かしCM-セルローズカラム(3×15cm)にapplyし次のピリジン酢酸緩衝液で溶出した。0.01M(150ml), 0.025M(600ml), 0.05M(1200ml), 0.1M(900ml), 溶出曲線は理論の部図16参照, 0.05M流出部分(画分I)を集め減圧下溶媒を溜去しさらに凍結乾燥して白色羽毛状粉末を得た。収量0.28g(3.12%), $[\alpha]_D^{25} - 65.8^\circ$ ($C=0.4$, H_2O), R_f^1 0.27, R_f^2 0.56×Phe, ニンヒドリン, Ehrlich, 坂口, Pauly 反応陽性の単一スポットを示した。 γ 紙電気泳動(0.1Mピリジン酢酸緩衝液, pH 3.5, 6.8; 1000V, 2時間)においていずれの場合もニンヒドリン反応陽性の単一スポットを示した。酸加水分解物のアミノ酸比:
 His 0.92 Phe 1.06 Arg 0.90 Gly 1.11 Ser 0.94 Pro 2.04 Lys 0.88
 Asp 1.00(回収率96%), LAP(粗製品)消化物のアミノ酸比: His 1.00 Phe 0.99
 Arg 1.04 Trp 0.93 Gly 0.96 Ser 0.90 Pro 2.06 Lys(CHO) 1.06
 Asp 0.75(回収率85%)



理論値: C, 50.0; H, 6.8; N, 16.5; CH_3COOH , 4.2

実験値: C, 50.0; H, 6.9; N, 16.9; CH_3COOH , 4.1

画分IIよりH-His-Phe-Arg-Trp-Gly-OHを回収した。

〔I-D〕 脱ホルミル化反応

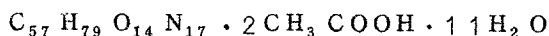
i) N^{ϵ} -Formyllysineの脱ホルミル化反応

N^{ϵ} -Formyllysine (1.00g)を水(20ml)に溶かし80%ヒドラジンヒドレート(5ml)を加え、38℃, 48時間放置後減圧下水, ヒドラジンを溜去し残渣を水に溶かし凍結乾燥後デシケーター中濃硫酸上で乾燥しヒドラジンを完全に除く。残渣をPartridge系ペーパークロマトグラフィーで検索するとlysineと痕跡程度の N^{ϵ} -formyllysineを認めた。これを1規定塩酸(4ml)に溶かし脱色炭処理後減圧下濃縮しシロップ状物質を得た。ここへピリジンを中性になるまで加えると白色結晶が生じた。エタノールを加え結晶を γ 取, 収量0.84g(80%), m.p. 250~253°(decomp.), 混融による融点降下なし。 $[M]_D^{25} + 27.2^\circ$ ($C=1.4$, 1NHCl)(m.p. 263~264°, $[M]_D + 30.4^\circ$ in 5NHCl)

本品はIRスペクトルにおいて標品の lysine monohydrochloride と一致した。

ii) H-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys-Asp-OH (23)

H-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys (CHO)-Asp-OH (0.16 g) を水 (1 ml) に溶かし 80% ヒドラジンヒドレート (0.2 ml) を加え 38°C, 2 日間放置後凍結乾燥を行った。残渣を Partridge 系ペーパークロマトグラフィーにて検索すると 3 つのスポットを認めた。(Rf¹ 0.22, 0.29, 0.49), 水 (100 ml) に溶かし CM-セルローズカラム (2×5.5 cm) に apply し次のピリジン酢酸緩衝液を流した。0.02 M (200 ml), 0.05 M (450 ml), 0.1 M (700 ml), 0.2 M (200 ml), (図 18)。0.1 M 流出部 (画分 II) を集め減圧下溶媒を溜去しさらに凍結乾燥し羽毛状粉末を得た。収量 0.07 g (45%), $[\alpha]_D^{27} -6.25^\circ$ (C=0.3, H₂O), Rf¹ 0.22, Rf² 0.42 × Phe, ニンヒドリン, Ehrlich, 坂口, Pauly 反応陽性の単一スポットを示した。濾紙電気泳動 (0.1 M ピリジン酢酸緩衝液 pH 3.5, 6.8; 1000 V, 2 時間) においてニンヒドリン反応陽性の単一スポットを示した。酸加水分解物のアミノ酸比: His 1.00 Phe 0.98 Arg 0.97 Gly 0.92 Ser 0.93 Pro 2.07 Lys 1.03 Asp 1.00 (回収率 83%), LAP (粗製品) 消化物のアミノ酸比: His 1.13 Phe 1.09 Arg 0.86 Trp 1.00 Gly 1.19 Ser 0.71 Pro 1.90 Lys 0.79 Asp 0.61 (回収率 83%)。



理論値: C, 47.4; H, 7.1; N, 15.4; CH₃COOH, 7.8

実験値: C, 47.2; H, 7.1; N, 15.5; CH₃COOH, 5.1

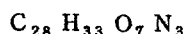
0.05 M 流出部分 (画分 I) に末反応の原料 (22) (33 mg) を回収した以外に, 0.2 M 流出部分 (画分 III) に H-His-Phe-Arg-Trp-Gly-OH (15 mg) を得た。本品の酸加水分解物のアミノ酸比: His 1.07 Phe 0.96 Arg 0.93 Gly 1.00 (回収率 75%)

[I-E] H-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-OH (29) の合成

i) Z-Ser-Pro-Pro-OBzl (25)

Z-Ser-Pro-OH (5.04 g) と H-Pro-OBzl (hydrochloride (3.61 g) より) を混酸無水物法により縮合しメタノールより再結晶して白色針状結晶を得た。収量 4.12 g

(53%), m.p. 129~131°, $[\alpha]_D^{18} -134.5^\circ$ (C=1.0, MeOH)。酸加水分解物のアミノ酸比: Ser 1.0:0 Pro 2.1:1 (回収率89.7%)。

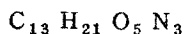


理論値: C, 64.2; H, 6.4; N, 8.0

実験値: C, 64.5; H, 6.6; N, 8.0

II) H-Ser-Pro-Pro-OH (26)

Z-Ser-Pro-Pro-OBzl (3.80g) を95%水性メタノール (50ml) に溶かし酢酸存在下パラジウムを触媒とする接触還元を行い生ずる白色結晶を水を加えて溶かし、触媒を濾去後濾液を減圧濃縮し水とエタノールより再結晶して白色結晶を得た。収量1.91g (88%), m.p. 177~181° (decomp.), $[\alpha]_D^{20} -186.5^\circ$ (C=1.0, H₂O), Rf¹ 0.32, Rf² 0.22 × Phe, ニンヒドリン反応陽性の単一スポットを示した。酸加水分解物のアミノ酸比: Ser 1.0:0 Pro 2.2:3 (回収率86.3%), LAP (粗製品) 消化物のアミノ酸比: Ser 1.0:0 Pro 2.1:0 (回収率75%)



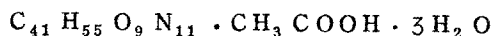
理論値: C, 52.2; H, 7.1; N, 14.0

実験値: C, 52.2; H, 7.3; N, 13.9

III) H-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-OH (29)

文献記載の方法⁶³⁾で合成したZ-Phe-Arg(NO₂)-Trp-Gly-OH (0.40g) と H-Ser-Pro-Pro-OH (0.15g) のトリエチルアミン塩とを常法に従い混酸無水物法で縮合してZ-Phe-Arg(NO₂)-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-OH の粗製品を得た。本品を50%酢酸 (40ml) に溶かしパラジウムを触媒として接触還元を行った。反応溶液をsec-butanol-ammonia系のペーパークロマトグラフィーで検索するとRf 0.93とRf 1.02にニンヒドリン、坂口、Ehrlich 反応陽性の2つのスポットが現れた。パラジウムを濾去後溶媒を溜去しさらに凍結乾燥した。本品を水 (200ml) に溶解し、CM-セルローズカラム (3×16cm) に吸着させ、0.025M (660ml), 0.05M (825ml) のピリジン酢酸緩衝液 (pH 5.0) で溶出し各フラクションの280mμにおける吸光度を測定した。(図20) ペーパークロマトグラフィーに現れた2つのスポットのうち1つは0.025M流出部分 (画分I) にあり、他は0.05M流出部分 (画分II) に存在した。後者はH-Phe-Arg-Trp-Gly-OHの標品に一致した。画分Iを集め、溶媒を溜去、次いで凍結乾燥を行い羽毛状物質を得た。収

量 0.22 g (49%), $[\alpha]_D^{24} - 64.9^\circ$ ($C=0.9$, H_2O), Rf^1 0.45, Rf^2 0.93 ×
Phe, ニンヒドリン, 坂口, Ehrlich 反応陽性の単一スポットを示した。酸加水分解物のア
ミノ酸比: Phe 1.00 Arg 0.97 Gly 1.00 Ser 0.93 Pro 1.99 (回収率 83.5%)
LAP (粗製品) 消化物のアミノ酸比: Phe 1.03 Arg 0.91 Trp 1.00 Gly 1.00
Ser 1.08 Pro 2.08 (回収率 85%)



理論値: C, 53.8; H, 6.8; N, 16.1

実験値: C, 53.6; H, 6.9; N, 15.9

IV) Ac-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-OH (30)

H-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-OH · 2HCl (0.05 g) と Na
HCO₃ (0.026 g) の水溶液 (1.5 ml) に氷冷下無水酢酸 (0.01 ml) を加え同温度で 2
時間撈拌を続けた。溶媒を溜去し残渣を水 (170 ml) に溶かして CM-セルローズカラム (2
× 10 cm) に吸着させ、さらに水で溶出した。各フラクション (10 ml) の 280 mμ の吸光度
を測定した。Tube No 11~40 を集め濃縮後凍結乾燥して白色羽毛状粉末を得た。収量 0.046
g (87%), $[\alpha]_D^{15} - 42.2^\circ$ ($C=0.4$, H_2O), Rf^1 0.66, ニンヒドリン反応陰性,
Ehrlich, 坂口反応陽性の単一スポットを示した。酸加水分解物のアミノ酸比: Phe 1.08 Arg
1.00 Gly 1.12 Ser 0.97 Pro 2.08 (回収率 93%)

{ II } 第四章に関する実験

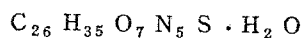
H-Pro-Tyr-Arg-Met-OH(41) の合成

i) Z-Arg(Tos)-Met-OMe(31)

Z-Arg(Tos)-OH(8.55g)とH-Met-OMe(hydrochloride(3.66g)より)とを混酸無水物法により常法に従って縮合し, Z-Arg(Tos)-Met-OMeを油状物質として得た。収量10.6g(95%), $[\alpha]_D^{20} + 1.5^\circ$ (C=1.4, MeOH), Rf^3 0.70, Rf^4 0.84, I_2 , メチオニン反応陽性の単一スポットを示した。

ii) Z-Arg(Tos)-Met-OH(32)

Z-Arg(Tos)-Met-OMe(2.10g)をメタノール(10ml)に溶かし, 1規定水酸化ナトリウム(4.1ml)を加え, 室温にて1時間攪拌。減圧下溶媒を溜去し, 残渣を水に溶かし酢酸エチルで洗い, 水層を2規定塩酸で酸性にし生ずる沈澱を酢酸エチルで抽出した。有機層を水洗後, Na_2SO_4 上で乾燥し溶媒を溜去した。残渣を乾燥してZ-Arg(Tos)-Met-OHを無晶形粉末として得た。収量1.80g(93%), $[\alpha]_D^{23} - 48.5^\circ$ (C=1.4, MeOH), Rf^3 0.65, Rf^4 0.51, I_2 , メチオニン反応陽性の単一スポットを示した。

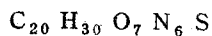


理論値: C, 51.1; H, 6.1; N, 11.4

実験値: C, 50.9; H, 6.2; N, 11.4

iii) Z-Arg(NO₂)-Met-OMe(33)

Z-Arg(NO₂)-OH(5.30g)とH-Met-OMe(hydrochloride(3.00g)より)とを混酸無水物法で常法に従って縮合し, メタノールより再結晶した。収量5.27g(70%), m.p. 137~138°, $[\alpha]_D^{26} - 25.6^\circ$ (C=1.2, MeOH), Rf^3 0.72, Rf^4 0.85, I_2 , メチオニン反応陽性の単一スポットを示した。

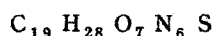


理論値: C, 48.2; H, 6.4; N, 16.9

実験値: C, 48.3; H, 6.1; N, 16.9

iv) Z-Arg(NO₂)-Met-OH (34)

Z-Arg(NO₂)-Met-OMe (2.49 g) をメタノール (40 ml) に溶かし, 1 規定水酸化ナトリウム (15 ml) を加え, 室温にて1時間攪拌後常法により処理しメタノールより再結晶して白色結晶を得た。収量 2.10 g (87%), m.p. 161~162°, $[\alpha]_D^{24} -13.3^\circ$ (C=1.4, MeOH), Rf³ 0.63, Rf⁴ 0.71, I₂, メチオニン反応陽性の単一スポット

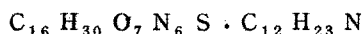


理論値: C, 47.4; H, 5.9; N, 17.1

実験値: C, 47.4; H, 5.8; N, 17.4

v) Boc-Arg(NO₂)-Met-OH (34) の dicyclohexylamine 塩

Boc-Arg(NO₂)-OH (2.0 g) と H-Met-OMe (hydrochloride (1.4 g) より) とを混酸無水物法により常法に従って縮合し, Boc-Arg(NO₂)-Met-OMe を油状物質として得た。(収量 2.36 g (74%), Rf³ 0.75, Rf⁴ 0.79)。本品 (2.30 g) をメタノールに溶かし1規定水酸化ナトリウム (6.7 ml) を加え氷浴中40分間攪拌後常法により処理して Boc-Arg(NO₂)-Met-OH を得た。(収量 2.06 g (90%) Rf³ 0.63, Rf⁴ 0.67), 本品 (2.0 g) をアセトン (4 ml) に溶かし dicyclohexylamine (2.0 ml) を加えると白色結晶を生じた。アセトンとエーテルより再結晶した。収量 2.38 g (80%), m.p. 117~118°, $[\alpha]_D^{20} +6.4^\circ$ (C=0.7, MeOH)



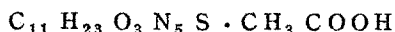
理論値: C, 53.3; H, 8.4; N, 15.5

実験値: C, 53.1; H, 8.7; N, 15.4

vi) H-Arg-Met-OH (37)

a) Z-Arg(Tos)-Met-OH (1.20 g) を液体アンモニア (約200 ml) に溶解し, アセトンとドライアイスで冷やし攪拌しながら金属ナトリウムの小片を反応液が青色を保つまで加えその後30分間攪拌し, 次いで反応液に塩化アンモニウムを加えて脱色した後室温にてアンモニアを気散させ, 残った少量のアンモニアを窒素ガスを通じて除去し残渣をデシケーター中硫酸上で乾燥。本品を Partridge 系のペーパークロマトグラフィーでニンヒドリン発色により検索すると Rf 0.40 の主成分と Rf 0.17, 0.35 の微量成分が現れた。本品を水 (500 ml) に溶かし酢酸で pH7 に調節し Amberlite CG-50 (H⁺型) カラムに charge した。引き続き水 (2000 ml), 0.01 M ピリジン酢酸緩衝液 (pH 5.0) により溶出した。溶出液を 23 ml

宛分取しニンヒドリン、坂口、メチオニン反応を行って検索し、Tube No 151~280を集め溶媒を減圧溜去し、水とエタノールより再結晶した。収量0.60g (81%), m.p. 185~186°, $[\alpha]_D^{22} +18.9^\circ$ (C=1.2, H₂O), Rf¹ 0.40, Rf² 0.53×Phe, ニンヒドリン、坂口、メチオニン反応陽性の単一スポットを示した。酸加水分解物のアミノ酸比: Arg 1.07 Met 1.00 (回収率92%), LAP (粗製品) 消化物のアミノ酸比: Arg 1.05 Met 1.00 (回収率95%)



理論値: C, 42.7; H, 7.7; N, 19.2

実験値: C, 42.6; H, 7.9; N, 19.0

b) Z-Arg(NO₂)-Met-OH (1.41g) とアニソール (2.1ml) をダイフロン of 容器に入れドライアイスとメタノールで冷やししながら無水弗化水素 (約50ml) を捕集し氷冷下30分間攪拌し、減圧下同温度で弗化水素を溜去し残渣を水酸化カリウムを含むデシケーターの中で乾燥した。残渣を水に溶かしてAmberlite IRA-400 (Acetate cycle) で処理し、樹脂を溜去後水を溜去し残渣を水とエタノールより再結晶した。収量0.89g (87%), m.p. 184~185°, a) で得た標品と混融しても融点降下を示さなかった。 $[\alpha]_D^{22} +18.8^\circ$ (C=0.9, H₂O), Rf¹ 0.40, ニンヒドリン、坂口、メチオニン反応陽性の単一スポットを示した。

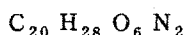
c) Boc-Arg(NO₂)-Met-OH (0.50g) をギ酸 (10ml) に溶かし、塩化第一錫 (1.45g) を加え50℃にて14時間反応後溜過した。溜液を減圧濃縮し残渣を水に溶かしニ硫化水素を通じ生ずる沈殿を溜去した。溜液を酢酸エチルで洗い、Amberlite IRA-400 (Acetate cycle) で処理し水を溜去後残渣を水とエタノールより再結晶した。収量0.15g (35%), m.p. 180~184°, a) で得た標品との混融182~186°, $[\alpha]_D^{20} +16.9^\circ$ (C=1.1, H₂O), Rf¹ 0.40, ニンヒドリン、坂口、メチオニン反応陽性の単一スポットを示した。

vii) Z-Arg(NO₂)-Met-OH (34) の液体アンモニア中金属ナトリウム処理
Z-Arg(NO₂)-Met-OH (0.30g) を液体アンモニア (約50ml) に溶かし常法により金属ナトリウムの小片を加え20分間反応後、塩化アンモニウムを加えて脱色し、液体アンモニアを気散させた。残渣を硫酸のデシケーター中で乾燥後Partridge系のペーパークロマト

グラフィーでニンヒドリン発色により検索すると Rf 0.06, 0.28, 0.32, 0.59 にスポットが現れた。

VIII) Boc-Pro-Tyr-OMe (38)

Boc-Pro-OH (4.30 g) と H-Tyr-OMe (hydrochloride (4.63 g) より) を混酸無水物法で常法により縮合し Boc-Pro-Tyr-OMe を得た。収量 7.09 g (90%)
m. p. 63~64°, $[\alpha]_D^{19} - 36.2^\circ$ (C=1.3, MeOH)

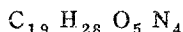


理論値: C, 61.2; H, 7.2; N, 7.1

実験値: C, 60.6; H, 7.5; N, 7.0

IX) Boc-Pro-Tyr-NHNH₂ (39)

Boc-Pro-Tyr-OMe (11.3 g) をエタノール (10 ml) に溶かし 80% ヒドラジンヒドレート (6.0 ml) を加え室温にて一夜放置後溶媒を溜去しエタノールとエーテルより再結晶した。収量 10.05 g (95%), m. p. 174~176°, $[\alpha]_D^{21} - 61.7^\circ$ (C=0.6, MeOH)



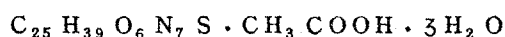
理論値: C, 58.2; H, 7.2; N, 14.3

実験値: C, 57.6; H, 7.3; N, 14.3

X) H-Pro-Tyr-Arg-Met-OH (41)

この反応操作はすべて低温室 (4°C) で行った。Boc-Pro-Tyr-NHNH₂ (0.94 g) を DMF (6 ml) に溶解し、亜硝酸ナトリウム (0.18 g) を少量の水に溶かして加えた。寒剤で冷やしながらか規定塩酸 (4.8 ml) を加え、4 時間攪拌後トリエチルアミンを加え pH 8 附近に調節しこの反応液を H-Arg-Met-OH (0.73 g) とトリエチルアミン (0.28 ml) の水溶液 (1.5 ml) に加え、2 4 時間攪拌後さらにアチド (hydrazide (0.94 g) より調製) を加え 2 4 時間攪拌した。溶媒を減圧下溜去し残渣に水と酢酸エチルを加えると水層と酢酸エチル層との間に油状物質が分離した。酢酸エチル層を除去し n-ブタノールで抽出し n-ブタノールを溜去した。残渣を無水リン酸、水酸化カリウムを含むデシケーターで乾燥し、トリフルオロ酢酸 (3 ml) を加え室温にて 40 分間放置し、乾燥エーテルを加え生ずる沈殿を濾取後水 (500 ml) に溶かし CM-セルローズカラム (3×30 cm) に charge し次のピリジン酢酸緩衝液

(pH 5.0) で流出した。0.01 M (500 ml) , 0.02 M (1000 ml) , 0.1 M (500 ml) , 0.2 M (300 ml) 。流出液を 2.4 ml 宛分取し 275 m μ における吸光度を測定した。0.02 M 溶出部を集め溶媒を溜去後凍結乾燥を行って羽毛状物質を得た。収量 0.72 g (50%) , $[\alpha]_D^{22} -23.2^\circ$ (C=0.2, H₂O) , Rf¹ 0.30 ニンヒドリン, Pauly, 坂口, メチオニン反応陽性の単一スポットを示した。酸加水分解物のアミノ酸比: Pro 1.03 Tyr 0.94 Arg 1.00 Met 0.76 (回収率 81%) , LAP (粗製品) 消化物のアミノ酸比: Pro 1.04 Tyr 1.01 Arg 1.00 Met 1.00 (回収率 67%)



理論値: C, 47.7; H, 7.3; N, 14.4

実験値: C, 47.5; H, 6.7; N, 13.9

xi) N^ε-Formyllysine の無水弗化水素処理

N^ε-Formyllysine (0.5 g) とアニソール (0.5 ml) をダイフロン of the container に入れ無水弗化水素 (約 5 ml) を捕集し 0°C にて 1 時間半攪拌後減圧下弗化水素を溜去し残渣を水酸化カリウム上で乾燥後水に溶かし Dowex-50 (ammonium cycle 3 g) を加え 2 時間攪拌した。樹脂を溜去後溜液を濃縮し残渣にアセトンを加え結晶状粉末を得た。収量 0.46 g, m. p. 216~218°, 原料と同じであった (回収率 92%) 。ペーパークロマトグラフィーにおいて lysine は存在しなかった。

xii) N^ε-Formyllysine のトリフルオロ酢酸処理

N^ε-Formyllysine (0.50 g) をトリフルオロ酢酸 (2 ml) に溶かし室温にて 2 時間放置後減圧下トリフルオロ酢酸を溜去し残渣をエタノール (30 ml) に溶かしトリエチルアミンにて pH 6 附近に調整し生じた白色沈澱を溜取した。収量 0.45 g (90%) , m. p. 216~220°, 標品との混融にて融点降下は見られなかった。Partridge 系クロマトグラフィーで検索するに N^ε-formyllysine 以外のスポットはなかった。

〔Ⅲ〕 第五章に関する実験

H-Pro-Tyr-Arg-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys(CHO)-Asp-OH(50)の合成

1) H-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys(CHO)-Asp-OH(43)

H-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys(CHO)-Asp-OH(1.42g)を水(10ml)に溶かし1規定塩酸(6.0ml)を加えた後凍結乾燥しその trihydrochloride を得た。本品を95%水性DMF(20ml)に溶かし1モルトリエチルアミンのDMF溶液(4ml)とZ-Glu(OBzl)-ONp(1.23g)を加え、室温にて20時間攪拌後減圧下溶媒を溜去し、残渣に酢酸エチルを加え生ずる沈澱を濾取し酢酸エチルで洗滌した。収量1.50g。本品を40%酢酸(100ml)に溶かしパラジウムを触媒とする接触還元を行った。1時間後水(60ml)を加えさらに6時間接触還元した後パラジウムを濾去し濾液を減圧下濃縮し残渣を凍結乾燥後減圧下水酸化カリウム上で乾燥した。本品を水(500ml)に溶かしCM-セルローズカラム(3×23cm)にapplyし次のピリジン酢酸緩衝液(pH 5.0)で順次溶出した。0.01M(1800ml), 0.025M(1400ml), 0.1M(1000ml)。溶出液は20ml宛分取し280mμにおける吸光度を測定した。(図26)。0.025M流出部分(画分Ⅱ)を集め減圧下溶媒を溜去後凍結乾燥し白色羽毛状粉末を得た。収量0.92g(60.2%), $[\alpha]_D^{20} -73.6^\circ$ (C=0.4, H₂O), Rf¹ 0.20, Rf² 0.22×Phe, Rf³ 0.28, ニンヒドリン, Ehrlich, 坂口反応陽性の単一スポットを示した。濾紙電気泳動(0.1Mピリジン酢酸緩衝液 pH 3.5, 6.8, 1000V, 2時間)においてニンヒドリン反応陽性の単一スポットを示した。酸加水分解物のアミノ酸比: Glu 1.00 His 0.92 Phe 0.89 Arg 0.87 Gly 1.03 Ser 1.01 Pro 1.98 Lys 1.12 Asp 1.04 (回収率 100%)。LAP(粗製品)消化物のアミノ酸比: Glu 0.68 His 0.76 Phe 1.06 Arg 1.27 Trp 0.97 Gly 1.26 Ser 0.72 Pro 2.15 Lys(CHO) 1.00 Asp 0.93 (回収率96%, Glu 補正值 1.06)

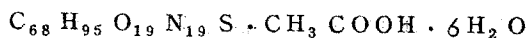


理論値: C, 49.2; H, 6.7; N, 15.9

実験値: C, 49.3; H, 7.1; N, 15.6

Ⅱ) H-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys (CHO)-Asp-OH (45)

H-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys (CHO)-Asp-OH (0.75 g) を前記したと同様にその塩酸塩に変えた。この塩酸塩 (0.79 g) を DMF (10 ml) に溶かしトリエチルアミン (0.22 ml) と Boc-Met-ONp (0.39 g) を加え窒素気流中で12時間攪拌した。減圧下溶媒を溜去し残渣に酢酸エチルを加え生じた沈殿を濾取し、さらに酢酸エチルで洗った後乾燥した。本品にトリフルオロ酢酸 (1 ml) を加え、30分間室温にて放置後硫酸第一鉄で処理した乾燥エーテル (150 ml) を加え、生じた沈殿を濾取後デシケーター中水酸化カリウム上で一夜乾燥し凍結乾燥を行って羽毛状粉末を得た。本品を水 (300 ml) に溶かし30%アンモニア水を加えて pH 4.5 に調節後 CM-セルローズカラム (3×100 cm) に apply し、さらに水 (700 ml) を流してから次のピリジン酢酸緩衝液 (pH 5.0) で順次溶出した。0.01 M (2200 ml), 0.05 M (700 ml)。 (図28)。流出液を20 ml 宛分取し280 mμ における吸光度を測定した。0.01 M 流出部分 (画分 I) を集め、減圧下溶媒を溜去後凍結乾燥を行って白色羽毛状粉末を得た。収量 0.49 g (56%), $[\alpha]_D^{20} -66.6^\circ$ (C=0.8, H₂O), Rf¹ 0.11, Rf² 0.33×Phe, Rf³ 0.25, ニヒドリン, Ehrlich, メチオニン反応陽性の単一スポットを示した。酸加水分解物のアミノ酸比: Met 1.05 Glu 1.01 His 1.04 Phe 0.97 Arg 0.92 Gly 1.00 Ser 0.97 Pro 1.97 Lys 1.14 Asp 1.02 (回収率100%)



理論値: C, 50.0; H, 6.6; N, 15.8

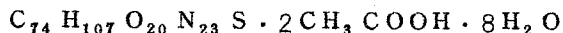
実験値: C, 50.1; H, 7.2; N, 15.8

Ⅲ) H-Arg-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys (CHO)-Asp-OH (48)

H-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys (CHO)-Asp-OH (0.48 g) を水 (0.5 ml) と DMF (6 ml) の混液に溶かしトリエチルアミン (0.04 ml) を加えた。一方 Boc-Arg(NO₂)-OH (0.19 g) を乾燥テトラヒドロフラン (10 ml) に溶かし、トリエチルアミン (0.10 ml) を加え寒剤で冷却しながらクロロ炭酸イソブチル (0.10 ml) を加えて15分間攪拌後上のペプチド溶液に加え、0℃にて30分間、さらに室温にて2時間攪拌した。減圧下溶媒を溜去し残渣に酢酸エチルを加え生じた粉末を濾取した。本粉末を薄層クロマトグラフィーで検索するに2つのスポットが現れた。Rf⁴ 0.53

(微量成分), $R_f^{4.0} 0.57$ (主成分)。こゝに得られた粉末 (0.66 g) を乾燥後 ダイフロン の容器に入れ, アニソール (0.7 ml) を加え無水弗化水素 (約 10 ml) を捕集後水浴中にて 2 時間攪拌した後同温度にて, 減圧下弗化水素を溜去し, 残渣をデシケーター中水酸化カリウム上にて一夜乾燥した。残渣を水 (30 ml) に溶かしフィルターセルを使用して濾過後濾液を凍結乾燥した。 $R_f^{4.0} 0.17$ (ニンヒドリン, Ehrlich 反応陽性), $R_f^{4.0} 0.40$ (ニンヒドリン 反応陰性, Ehrlich 反応陽性)。こゝに得られた粉末を水 (50 ml) に溶かし Amberlite CG-4B (acetate cycle 約 4 g) を加え 2 時間攪拌後樹脂を濾去し, 濾液を凍結乾燥した。残渣を水 (500 ml) に溶かし CM-セルローズカラム (2×13 cm) に apply した後, 次の酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 6.9) で順次溶出した。流出液は 20 ml 宛分取し, 各フラクションの 280 m μ における吸光度を測定した。目的とする N⁶-formyltridecapeptide (48) は 0.02 M から 0.06 M 部分 (Tube No. 130~210) に巾広いピークとなって流出した。この部分を集め大部分の溶媒を溜去した後, 凍結乾燥をくり返し白色羽毛状粉末を得た。収量 0.45 g (84%), $[\alpha]_D^{20} -36.7^\circ$ (C=0.2, 1 N AcOH), $R_f^{4.0} 0.44$ ニンヒドリン, メチオニン, 坂口, Ehrlich, Pauly 反応陽性 (精製すると R_f 値は 0.17 から 0.44 へと増加した), $R_f^{4.0} 0.53$ にニンヒドリン反応陰性, 坂口, メチオニン, Ehrlich, Pauly 反応陽性のスポットが僅かに混在した (このスポットは精製前の $R_f 0.40$ のスポットに相当する)。次の反応にはこの段階の製品を使用した。

本品の一部 (0.15 g) を水 (500 ml) に溶かし, CM-セルローズカラム (2×10 cm) に apply し次の酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 6.9) で順次溶出した。0.01 M (750 ml), 0.02 M (750 ml), 0.04 M (900 ml), 0.06 M (750 ml)。流出液は 15 ml 宛分取し, 280 m μ における吸光度を測定した。(図 31) 0.02 M 流出部分 (画分 II, Tube No. 115~135) を集め, 溶媒を溜去後凍結乾燥をくり返し白色羽毛状粉末を得た。収量 0.07 g (46%), $[\alpha]_D^{20} -55.6^\circ$ (C=0.2, 1 N AcOH), $R_f^{4.0} 0.44$ ニンヒドリン, Ehrlich, メチオニン反応陽性の単一スポットを示した。酸加水分解物のアミノ酸比: Arg 1.98 Met 0.97 Glu 1.01 His 1.03 Phe 0.97 Gly 1.00 Ser 0.87 Pro 1.92 Lys 1.03 Asp 1.01 (回収率 95%)



理論値: C, 48.4; H, 6.8; N, 16.6

実験値: C, 48.4; H, 7.1; N, 16.0

0.01 M 流出部分 (画分 I) に副反応物, urethan (47) (0.02 g, $R_f^{4.0} 0.53$) を得た。

なおクロル炭酸エチルを使用して本縮合反応を行った際にも副反応物, urethan の生成を認めた。

IV) H-Pro-Tyr-Arg-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser
-Pro-Pro-Lys(CHO)-Asp-OH(50)

この反応はすべて低温室(4°C)で行った。Boc-Pro-Tyr-NHNH₂(0.24g)をDMF(10ml)に溶かし1モル亜硝酸ナトリウム水溶液(0.8ml)を加え寒剤で冷却下撹拌しながら1規定塩酸(1.6ml)を滴下しさらに5分間撹拌を続けた後1モルトリエチルアミンのDMF溶液(1.0ml)を加えBoc-Pro-Tyr-N₃を調製した。この反応混合物を1回目の精製で得られたH-Arg-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys(CHO)-Asp-OH(0.51g)とトリエチルアミン(0.07ml)を含む80%水性DMF(11ml)中に冷却下加えて撹拌した。12時間後さらに0.17gのhydrazideから調製したazideを加え撹拌を続けた。反応混合物を薄層クロマトグラフィーで検索するに、ニンヒドリン反応陽性のスポットは完全に消失し、新しくRf⁴ 0.71にEhrlich 反応陽性のスポットが現れた。減圧下溶媒を溜去し残渣に酢酸エチルを加え生じた粉末を濾取し、酢酸エチルで洗滌後乾燥した。本品にトリフルオロ酢酸(1ml)を加え室温にて30分間放置後硫酸第一鉄で処理した乾燥エーテルを加え生じた沈澱を濾取し、減圧下水酸化カリウム上で乾燥した。本品を水(30ml)に溶かしAmberlite CG-4B(Type I, 約5g)で処理後樹脂を濾去し濾液を凍結乾燥した。得られた粉末を水(600ml)に溶かしCM-セルローズカラム(2×13cm)にapplyし次の酢酸アンモニウム緩衝液(pH 6.9)で溶出した。0.005M(750ml), 0.01M(600ml), 0.05M(800ml), 0.1M(700ml)。流出液を15ml 宛分取し各フラクションの280mμにおける吸光度を測定した。(図33)。0.01M流出部分に、混入していたurethan(47)が少量のN^ε-formylpentadecapeptide(50)を伴って流出した。目的とするペプチドを含む0.05M流出部分(画分I)(Tube No.130~190)を集め減圧下溶媒を溜去後凍結乾燥を繰り返して白色羽毛状粉末を得た。収量0.49g(86%), $[\alpha]_D^{30} - 60.7^\circ$ (C=0.3, 1N AcOH), Rf⁴ 0.47, ニンヒドリン, Ehrlich, 坂口, メチオニン反応陽性の単一スポットを示した。濾紙電気泳動(pH 4.0の0.1Mピリジン酢酸緩衝液, 900V, 2時間)において単一の挙動を示した。酸加水分解物のアミノ酸比: Pro 3.17 Tyr 0.88 Arg 1.82 Met 0.92 Glu 1.01 His 0.97 Phe 1.00 Gly 0.97 Ser 0.84 Lys 1.06 Asp 1.00 (回収率89%)。LAP(粗製品)消化物のアミノ酸比: Pro 2.90 Tyr 1.00 Arg 2.08 Met

1.26 Glu 0.68 His 1.35 Phe 1.28 Trp 1.35 Gly 1.15 Ser 0.93
 Lys (CHO) 1.11 Asp 0.83 (回收率82%, Glu 補正值 1.06)^{註2)}

$C_{88}H_{123}O_{23}N_{25}S \cdot 2CH_3COOH \cdot 9H_2O$

理論値：C, 49.9 ; H, 6.8 ; N, 15.8

実験値：C, 50.6 ; H, 6.6 ; N, 15.0

〔Ⅳ〕 第六章に関する実験 サル の β -MSH の 全 合 成

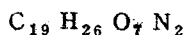
i) Z-Glu(OBu^t)-Gly-OMe (51)

a) Z-Glu(OBu^t)-OHのdicyclohexylamine塩(10.36g)とH-Gly-OMe·HCl(2.51g)をメタノール(110ml)に溶かし、減圧下メタノールを溜去し残渣にDMF(40ml)を加え、dicyclohexylamine hydrochlorideを溜去し溜液を寒剤で冷やししながらDCC(4.96g)を加えそのまま30分間攪拌後室温にて一夜攪拌。生じたDCC ureaを溜去し、溶媒を減圧下溜去し残渣を酢酸エチルに溶かし、10%クエン酸、飽和炭酸水素ナトリウム溶液、飽和食塩水でそれぞれ5回洗滌。Na₂SO₄上で乾燥後溶媒を溜去して油状物質を得た。収量1.4g(96%)、 $[\alpha]_D^{18} -1.4.0^{\circ}$ (C=1.5, MeOH), Rf³ 0.75, ニンヒドリン反応陰性, I₂ 反応陽性の単一スポットを示した。

b) Z-Glu(OBu^t)-OHのdicyclohexylamine塩(5.18g)を無水テトラヒドロフラン(20ml)に懸濁させ、寒剤で冷やししながらクロル炭酸エチル(0.96g)を加え15分間攪拌した。本反応混合物をH-Gly-OMe·HCl(1.88g)とトリエチルアミン(2.08ml)を含むテトラヒドロフラン溶液(30ml)に加えて2時間攪拌した。生成物の処理はa)に記したと同様にして行った。収量3.80g(93%)。

ii) Z-Glu(OBu^t)-Gly-OH (52) とその dicyclohexylamine 塩

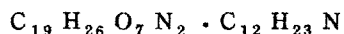
Z-Glu(OBu^t)-Gly-OMe(8.00g)をメタノール(50ml)に溶かし氷冷下1規定水酸化ナトリウム(19.6ml)を加えて1時間攪拌。10%クエン酸で中和しメタノールを溜去し残渣に1規定水酸化ナトリウムを加えて溶かし、エーテルで3回洗滌。水層を氷冷下10%クエン酸で酸性にし析出した油状物質を酢酸エチルで抽出し水洗、Na₂SO₄上で乾燥後溶媒を溜去して油状物質を得た。本品を冷蔵庫に放置すると結晶となったのでエーテルとn-ヘキサンより再結晶した。収量6.17g(80%)、m.p. 81~83°, $[\alpha]_D^{28} -1.2.0^{\circ}$ (C=1.0, MeOH)



理論値: C, 57.9; H, 6.6; N, 7.1

実験値: C, 57.9; H, 6.7; N, 7.4

Z-Glu(OBu^t)-Gly-OH (2.25 g) をアセトン (10 ml) に溶かし dicyclohexylamine (1.14 ml) を加え一夜放置し、結晶を濾取してメタノールとアセトンより再結晶した。収量 2.67 g (81%), m.p. 147~148°, $[\alpha]_D^{23} -5.2.0^\circ$ (C=1.5, MeOH)

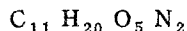


理論値: C, 64.7; H, 8.6; N, 7.3

実験値: C, 64.4; H, 8.7; N, 7.5

iii) H-Glu(OBu^t)-Gly-OH (53)

Z-Glu(OBu^t)-Gly-OH (1.12 g) をメタノール (100 ml) に溶かし、氷酢酸 (0.1 ml) を加えパラジウムを触媒とする接触還元を行った。反応中に析出した結晶を水を加えて溶かし触媒を濾去後、濾液を減圧濃縮し、残渣にメタノールを加え生ずる沈澱を水とメタノールより再結晶した。収量 6.77 g (92%), m.p. 190~192°, $[\alpha]_D^{23} +2.2.8^\circ$ (C=0.9, H₂O), Rf¹ 0.57 ニンヒドリン反応陽性の単一スポットを示した

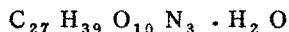


理論値: C, 50.8; H, 7.8; N, 10.8

実験値: C, 50.5; H, 7.9; N, 10.6

iv) Z-Asp(OBu^t)-Glu(OBu^t)-Gly-OH (54) とその dicyclohexylamine 塩

H-Glu(OBu^t)-Gly-OH (1.20 g) とトリエチルアミン (6.40 ml) を含む 75% 水性ジオキサン溶液 (280 ml) に Z-Asp(OBu^t)-ONp (2.455 g) を加え室温にて 3 日間攪拌した。減圧下溶媒を溜去し残渣を酢酸エチルに溶かし 10% クエン酸続いて水で洗滌し、Na₂SO₄ 上で乾燥し溶媒を溜去した。残渣をクロロホルムに溶かし溶媒を溜去後エーテルを加え下記するクロマトグラフィーで得た (54) の結晶を加えて冷蔵庫に一夜放置した。析出した結晶を濾取してクロロホルムとエーテルより再結晶した。収量 2.38 g (91%), m.p. 108~110°, $[\alpha]_D^{23} -2.0.2^\circ$ (C=1.1, MeOH)



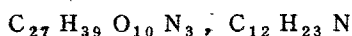
理論値: C, 55.6; H, 7.1; N, 7.2

実験値: C, 55.6; H, 7.3; N, 7.3

カラムクロマトグラフィーは次のようにして行った。即ち粗製の Z-Asp(OBu^t)-Glu

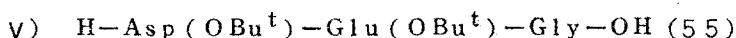
(O Bu^t)—Gly—OH (0.84 g) を少量のクロロホルムに溶かし、シリカゲルカラム (1.5 × 18 cm) に吸着させ、さらにクロロホルムを流した。3つのフラクションに分れて溶出されたが、最後のフラクションに目的物を得、クロロホルムとエーテルより再結晶した。収量 0.80 g (94.8 %)

こゝに得た (54) (0.30 g) をアセトン (1 ml) に溶かし dicyclohexylamine (0.11 ml) を加え冷蔵庫に放置し、析出した結晶をメタノールとアセトンより再結晶した。収量 0.32 g (80%), m. p. 181~182°, $[\alpha]_D^{24} -13.3^\circ$ (C=0.8, Me OH)

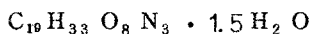


理論値: C, 62.7; H, 8.3; N, 7.5

実験値: C, 62.9; H, 8.6; N, 7.6

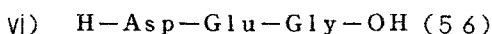


Z—Asp(O Bu^t)—Glu(O Bu^t)—Gly—OH (6.00 g) をメタノール (50 ml) にとかし酢酸 (0.9 ml) の存在下パラジウムを触媒とする接触還元を行った。パラジウムを濾去し、濾液を濃縮乾固し乾燥した後メタノールとエーテルより再結晶した。収量 4.20 g (92%), m. p. 114~116°, $[\alpha]_D^{23} -7.2^\circ$ (C=0.7, Me OH), Rf¹ 0.86, Rf² 0.82 × Phe ニンヒドリン反応陽性の単一スポットを示した。

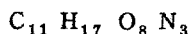


理論値: C, 49.8; H, 7.9; N, 9.2

実験値: C, 49.9; H, 7.6; N, 9.4



H—Asp(O Bu^t)—Glu(O Bu^t)—Gly—OH (0.80 g) をトリフルオロ酢酸 (2 ml) に溶かし室温にて1時間放置後、乾燥エーテルを加え生じた白色粉末を傾瀉して取り出し、さらに乾燥エーテルで洗滌し白色粉末を得た。本品を乾燥後水 (5 ml) に溶かしピリジン (0.5 ml) を加えて中和し、減圧下濃縮後エタノールを加え生ずる結晶を濾取し、水とエタノールより再結晶した。収量 0.41 g (70%), m. p. 222° (decomp.), Rf¹ 0.14, ニンヒドリン反応陽性の単一スポットを示した。酸加水分解物のアミノ酸比: Asp 0.98 Glu 1.00 Gly 1.00 (回収率 84%), LAP (Sigma Chem. Co.)⁶²⁾ 消化物のアミノ酸比: Asp 1.00 Glu 0.98 Gly 1.06 (回収率 90%)



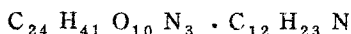
理論値：C, 41.4; H, 5.3; N, 13.2

実験値：C, 41.1; H, 5.2; N, 13.0

vii) Boc-Asp(OBu^t)-Glu(OBu^t)-Gly-OH (57) とその dicyclohexylamine 塩

H-Asp(OBu^t)-Glu(OBu^t)-Gly-OH (1.04 g) を DMF (15 ml) に溶かしトリエチルアミン (0.70 ml) を加え、氷冷下 *t*-butylazidoformate (0.60 g の *t*-butylcarbazate より調整) を加え 45°C にて 3 日間攪拌。DMF を溜去後残渣をエーテルに溶かし、5%アンモニア水で抽出しそのアンモニア層を 10%クエン酸で酸性にし酢酸エチルで抽出。有機層を水洗後 Na₂SO₄ 上で乾燥し溶媒を溜去し油状物質を得た。収量 1.14 g (81%)

得られた Boc-Asp(OBu^t)-Glu(OBu^t)-Gly-OH (0.35 g) をアセトン (1 ml) に溶かし dicyclohexylamine (0.13 ml) を加え冷蔵庫に一夜放置し、析出した結晶をアセトンとエーテルより再結晶した。収量 0.34 g (70%), m.p. 128~130°, $[\alpha]_D^{25} -15.3^\circ$ (C=0.8, MeOH)

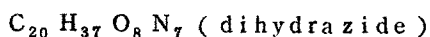


理論値：C, 60.7; H, 9.0; N, 7.9

実験値：C, 60.7; H, 9.3; N, 8.1

viii) Boc-Asp(OBu^t)-Glu(OBu^t)-Gly-OMe (58) とヒドラジンとの反応

Boc-Asp(OBu^t)-Glu(OBu^t)-Gly-OH (1.14 g) をメタノール (2 ml) に溶かし、ジアゾメタンのエーテル溶液を反応液の黄色が持続するまで加え、氷浴中にて 2 時間放置後酢酸を加え過剰のジアゾメタンを分解し、溶媒を溜去し相当するメチルエステルを油状に得た。収量 1.08 g (92%)。本品 (1.08 g) をメタノール (1 ml) に溶かし 80%ヒドラジンヒドレート (0.38 ml) を加え室温にて 3 日間放置した。反応液にエーテルを加え生ずる結晶を戸取した。収量 0.30 g (30%), m.p. 197~198°



理論値：C, 47.9; H, 7.4; N, 19.5

実験値：C, 47.9; H, 7.7; N, 19.5

(X) H-Asp-Glu-Gly-Pro-Tyr-Arg-Met-Glu-His-Phe-Arg
-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys (CHO)-Asp-OH (61)

Boc-Asp (OBu^t)-Glu (OBu^t)-Gly-OH (0.27 g) と N-hydroxysuccinimide (0.12 g) を酢酸エチル (10 ml) に溶かし寒剤で冷却下 DCC (0.10 g) を加え 0℃ にて 30 分間、室温にて一夜攪拌後尿素を除去、母液を減圧濃縮した。残渣に石油エーテルを加え、生じた無晶形物質を傾瀉して取り出し、H-Pro-Tyr-Arg-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys (CHO)-Asp-OH

(0.19 g) と トリエチルアミン (0.56 ml) を含む 90% DMF 溶液 (7 ml) に加え窒素置換し、室温にて 12 時間攪拌した。減圧下溶媒を溜去し、残渣に酢酸エチルを加えるとゲル状物質が析出した。ゲル状物質を遠心分離し (6000 rpm) さらに酢酸エチルで洗滌後乾燥した。本品にトリフルオロ酢酸 (1 ml) を加え、室温にて 2 時間放置後硫酸第一鉄処理した乾燥エーテルを加え生じた沈澱を遠心分離した。本粗製品 (R_f^4 0.57, 0.49, 0.34, 0.24, 0.10) を水 (10 ml) に溶かし室温にて一夜放置後凍結乾燥して羽毛状粉末を得た。 R_f^4 0.44, 0.17, 本品を水 (400 ml) に溶かし 5% アンモニアで pH 3.8 に調節し CM セルローズカラム (2×8 cm) に apply した後、水 (400 ml), 水 (300 ml) と 0.01 M 酢酸アンモニウム緩衝液 (1700 ml) とからなる linear gradient, 0.04 M 酢酸アンモニウム緩衝液 (400 ml) で順次溶出した (図 37)。流出液を 10 ml 宛分取し各フラクションの 280 mμ における吸光度を測定し、linear gradient 流出部分 (Tube No. 125~210) を集め溶媒を溜去後凍結乾燥を 3 回繰返し白色羽毛状粉末を得た。収量 0.17 g (72%), $[\alpha]_D^{30}$ -63.6° (C=0.2, 1 N AcOH), R_f^4 0.49, ニンヒドリン, Ehrlich, メチオニン反応陽性の単一スポットを示した。母液電気泳動 (0.1 M ピリジン酢酸緩衝液, 1500 V, 2 時間, Phe を標準物質として用いた。) pH 3.5, (-) 3.18×Phe.; pH 6.8, (-) 1.28×Phe, 酸加水分解物のアミノ酸比: Asp 1.96 Glu 2.20 Gly 2.05 Pro 3.01 Tyr 0.67 Arg 1.99 Met 0.93 His 1.05 Phe 1.00 Ser 0.98 Lys 1.06 (回収率 96%), DNP 化後酸加水分解物のアミノ酸比: Asp 0.78 Glu 2.30 Gly 2.26 Pro 3.28 Arg 1.85 Phe 1.00 Ser 0.76 Lys 0.89 (回収率 76%) NMR (D₂O-CD₃COOD), τ : 1.95 (1H singlet, Lys N^ε-formyl), 1.35 (1H singlet, His imidazole) (図 38)

C₉₉ H₁₃₈ O₃₀ N₂₈ S · 2 CH₃ COOH · 7 H₂ O

理論値: C, 49.9; H, 6.5; N, 15.8

実験値: C, 50.1; H, 6.9; N, 15.3

X) H-Asp-Glu-Gly-Pro-Tyr-Arg-Met-Glu-His-Phe-Arg
-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys-Asp-OH (1)

[17N^ε-formyllysine] -サル-β-MSH (90mg) を10%ヒドラジン酢酸 (pH 6.0, 10ml) に溶かしメルカプトエタノール (0.7ml) を加え、窒素ガスで置換後 85~90° にて3時間加熱した。凍結乾燥して溶媒を溜去した後残渣を水 (500ml) に溶かし、CM-セルローズカラム (1.2×14cm) にapplyし、水 (1000ml), 水 (3000ml) と0.01M酢酸アンモニウム緩衝液 (650ml) とからなる linear gradient, 0.04 M酢酸アンモニウム緩衝液 (350ml) で順次溶出し、流出液を10ml 宛分取し各フラクションの280mμ における吸光度を測定した。その溶出曲線は理論の部図39のごとくであり linear gradient 流出部分に肩を持ったピークが現れた。画分Ⅱ (Tube No 97~135) を集め溶媒を溜去後凍結乾燥を繰り返し白色羽毛状粉末を得た。収量43mg (47%)。本品をワットマン電気泳動で検索するに、目的とするペプチド以外に少量の原料が混在していることを認めた。本品を水 (1000ml) に溶かしCM-セルローズカラム (1.2×5cm) にapplyし、水 (200ml) と0.01M酢酸アンモニウム緩衝液 (700ml) とからなる linear gradient で溶出した。図40に示すような単一のピークが現れた。画分Ⅰ (Tube No 39~59) を集め溶媒を溜去後凍結乾燥を繰り返し白色羽毛状粉末を得た。収量27mg (63%), $[\alpha]_D^{30} - 50.7^\circ$ (C=0.2, 1N AcOH), R_f^{40} 0.46, ニンヒドリン, Ehrlich, メチオン反応陽性の単一スポットを示した。ワットマン電気泳動 (0.1Mピリジン酢酸緩衝液, 1500V, 2時間, Phe を標準物質として用いた。) : pH 3.5, (—) 4.4×Phe; pH 6.8, (—) 2.1×Phe, 酸加水分解物のアミノ酸比: Asp 1.96 Glu 1.97 Gly 1.94 Pro 3.02 Tyr 0.79 Arg 2.01 Met 0.76 His 1.08 Phe 1.00 Ser 0.95 Lys 1.00 (回収率88%)。LAP (精製品, Sigma Chem. Co. Lot 16B-0201) 消化物のアミノ酸比: Asp 1.00 Glu 1.00 Gly 0.96 Pro 0.38 Tyr 0.53 Arg 1.00 Met 0.63 Phe 0.56 Ser 0.13 LAP (粗製品) 消化物のアミノ酸比: Asp 2.21 Glu 1.11 Gly 2.08 Pro 2.75 Tyr 1.11 Arg 1.64 Met 1.16 His 1.08 Phe 1.00 Trp 0.75 Ser 0.91 Lys 0.82 (回収率89%, Glu の補正值 1.74^{註)}) NMR (D₂O-CD₃COOD), τ: 1.35 (1H singlet, His imidazole) (図41)。

C₉₈ H₁₃₈ O₂₉ N₂₈ S · 3CH₃COOH · 7H₂O

理論値: C, 49.8; H, 6.6; N, 15.6

実験値: C, 50.1; H, 6.5; N, 15.1

第1回目のCM—セルローズカラムクロマトグラフィーにおいて画分Ⅰ（15 mg, 17%）は電気泳動で検索するに原料と目的物との混合物であった。又0.04 M流出部分（画分Ⅲ）に少量ではあるが目的物よりも陰極側に移動（電気泳動）する物質が流出したがこれが何であるかは検討しなかった。

本脱ホルミル化反応をthioglycolic acidの存在下, 5%および10%ヒドラジン酢酸にて37°, 48時間という条件で行い, 同様にしてCM—セルローズカラムクロマトグラフィーで精製するといずれの場合も約10%の目的物を得, 原料を約40%回収した。

引 用 文 献

- 1) T. H. Lee, A. B. Lerner, V. B. Janusch: J. Biol. Chem., 236, 1390 (1961).
- 2) E. P. Smith: Science, 44, 280 (1916).
- 3) M. B. Allen: Science, 44, 755 (1916).
- 4) J. W. Atwell: Science, 49, 47 (1919).
- 5) B. T. Fitzpatrick, A. B. Lerner: Science, 117, 640 (1953).
- 6) M. Gordon: Pigment Cell Growth Academic Press Inc. Publishers, New York, N. Y. 1953.
- 7) A. B. Lerner, T. H. Lee: J. Am. Chem. Soc., 77, 1066 (1955).
- 8) J. Porath, P. Roos, W. F. Landgrabe, M. G. Mitchell: Biochim. Biophys. Acta, 17, 598 (1955).
- 9) J. B. Benfey, L. J. Purvis: J. Am. Chem. Soc., 77, 5167 (1955).
- 10) T. H. Lee, A. B. Lerner: J. Biol. Chem., 221, 943 (1956).
- 11) J. I. Harris, P. Roos: Nature, 178, 90 (1956).
- 12) I. I. Geschwind, C. H. Li, L. Barnafi: J. Am. Chem. Soc., 78, 4494 (1956).
- 13) J. I. Harris, A. B. Lerner: Nature, 179, 1346 (1957).
- 14) J. I. Harris: Biochem. J., 71, 451 (1959).
- 15) I. I. Geschwind: "Columbia University Conference on Comparative Endocrinology" P, 421, Wiley, New York, 1958.
- 16) J. S. Dixon, C. H. Li: J. Am. Chem. Soc., 82, 4568 (1960).
- 17) I. I. Geschwind, C. H. Li, L. Barnafi: J. Am. Chem. Soc., 79, 1003, 6394 (1957).
- 18) J. S. Dixon, C. H. Li: Gen. Comp. Endocrinol., 1, 161 (1961).
- 19) J. I. Harris: Nature, 184, 167 (1957).
- 20) G. R. Shepherd, D. S. Wilson, S. K. Howard, H. P. Bell, S. D.

- Davis, B. S. Davis, A. E. Eigner, E. N. Shakespeare : J. Am. Chem. Soc., 78, 5068 (1955).
- 21) B. W. McGuinness : Ann. N. Y. Acad. Sci., 100, 640 (1963).
- 22) A. J. Kastin, G. T. Ross : Experientia, 20, 461 (1964).
- 23) K. Shizume, A. B. Lerner, T. B. Fitzpatrick : Endocrinol., 54, 553 (1954).
- 24) A. B. Lerner, M. R. Write : Methods of Biochem. Anal., 8, 295 (1960).
- 25) S. Lande, A. B. Lerner, G. V. Upton : J. Biol. Chem., 240, 4249 (1965).
- 26) F. L. Engel : Vitamins and Hormones, 19, 189 (1961).
- 27) W. Ferrai, G. L. Gessa, L. Vargiu, Ann. N. Y. Acad. Sci., 104, Art1 330 (1963).
- 28) C. Y. Bower, T. W. Redding, A. W. Schally : Endocrinol., 74, 559 (1964).
- 29) O. Kraye, E. B. Astwood, D. R. Wand, M. H. Alper : Proc. Natl. Acad. Sci., 47, 1227 (1961).
- 30) G. Cehovic : Compt. rend., 261, 1405 (1965).
- 31) W. A. Krivoy, R. Guillemin : Endocrinol., 69, 170 (1961).
- 32) St. Guttman, R. A. Boissonnas : Helv. Chim. Acta, 42, 1257 (1959).
- 33) K. Hofmann, H. Yajima, E. T. Schwartz : J. Am. Chem. Soc., 82, 3732 (1960).
- 34) R. Schwyzer, A. Costopanagiotis, P. Sieber : Helv. Chim. Acta, 46, 870 (1963).
- 35) H. Otuka, K. Inoue : Bull. Chem. Soc. Japan, 37, 289 (1964).
- 36) R. Schwyzer, H. Kappeler, B. Iselin, W. Rittel, H. Zuber : Helv. Chim. Acta, 42, 1702 (1959).
- 37) R. Schwyzer, B. Iselin, H. Kappeler, B. Riniker, W. Rittel, H. Zuber : Helv. Chim. Acta, 46, 1975 (1963).

- 38) F. Chillemi : Gazz. Chim. Ital., 96, 359 (1966).
- 39) H. Brookmann, N. Grubhofer, W. Kass, H. Kalbe : Chem. Ber., 84, 26 (1951).
- 40) M. M. Shemiakin, Y. A. Ovchinnikov, E. I. Vinogradova, M. Y. Feigina, A. A. Kiryushkin, N. A. Aldanova, Y. B. Alakhov, V. M. Lipkin, B. V. Rosinov : Experientia, 23, 428 (1967).
- 41) Z. Paulay, S. Bajusz : Acta Chim. Hung., 43, 147 (1965).
- 42) S. Sakakibara, Y. Shimonishi, Y. Kishida, M. Okada, H. Sugihara : Bull. Chem. Soc. Japan, 40, 2164 (1967), S. Sakakibara, Y. Kishida, R. Nishizawa, Y. Shimonishi : Ibid, 41, 437 (1968).
- 43) K. Hofmann, H. Yajima, T. Y. Liu, N. Yanaihara, C. Yanaihara, J. L. Humes : J. Am. Chem. Soc., 84, 4475 (1962).
- 44) K. Hofmann, H. Yajima, T. Y. Liu, N. Yanaihara, C. Yanaihara, J. L. Humes : J. Am. Chem. Soc., 84, 4481 (1962).
- 45) E. Schröder, K. Lübke : "The Peptides" Vol. I P, 201 (1965) Academic Press, New York
- 46) I. I. Geschwind, C. H. Li : Arch. Biochem. Biophys., 106, 200 (1964).
- 47) J. C. Sheehan, G. P. Hess : J. Am. Chem. Soc., 77, 1067 (1955).
- 48) J. R. Vaughan, R. L. Osato : J. Am. Chem. Soc., 74, 676 (1952).
- 49) R. A. Boissonnas : Helv. Chim. Acta, 34, 874 (1951).
- 50) T. Wieland, H. Bernhard : Ann., 572, 190 (1951).
- 51) M. Bodanszky, V. du Vigneaud : J. Am. Chem. Soc., 81, 5688 (1959).
- 52) J. Kovacs, A. Kapoor : J. Am. Chem. Soc., 87, 118 (1965).
- 53) G. W. Anderson, J. E. Zimmerman, F. M. Callahan : J. Am. Chem. Soc., 86, 1839 (1964).
- 54) T. Crutius, R. Wüstenfeld : J. prakt. Chem., 70, 73, 89

(1904) .

55) M. Brenner, W. Huber : *Helv. Chim. Acta*, 36, 1109 (1953).

56) K. Hofmann, E. Stütz, G. Spüler, H. Yajima, E. T. Schwartz :
J. Am. Chem. Soc., 82, 3727 (1960) .

57) R. W. Holley, E. Sondheimer : *J. Am. Chem. Soc.*, 81, 5688
(1959) .

58) T. Wieland, B. Heinke, K. Vogeler : *Ann.* 655, 189 (1962).

59) F. E. King, J. W. Clark-Lewis, D. A. Akidd, G. R. Smith : *J.*
Chem. Soc., (1954) 1039.

60) M. A. Ondetti, P. L. Thomas : *J. Am. Chem. Soc.*, 87, 4373
(1965) .

61) J. Meienhofer, C. H. Li : *J. Am. Chem. Soc.*, 84, 2434 (1962) .

62) D. H. Spackman, E. L. Smith, D. M. Brown : *J. Biol. Chem.*,
212, 255 (1955) . LAP粗製品はブタの腎臓抽出物を2回硫酸分画して製した。
本品はprolidase活性を持つのでPro を含むペプチドに対し有効であるが、低い
Glu の回収率を与える。(註2参照)。高度に精製されたLAPはSigmaより購入し
た。本品はほとんどprolidase活性を示さない。Lot 16B 0201.

63) K. Hofmann, S. Lande : *J. Am. Chem. Soc.*, 83, 2286 (1961) .

64) B. Iselin, R. Schwyzer : *Helv. Chim. Acta*, 43, 1760 (1960) .

65) S. Sakakibara, N. Inukai : *Bull. Chem. Soc. Japan*, 39,
1567 (1966) .

66) G. W. Anderson, F. M. Callahan, J. E. Zimmerman : *J. Am. Chem.*
Soc., 89, 178 (1967) .

67) J. Kovacs, L. Kisfaludy, M. Q. Ceprini : *J. Am. Chem. Soc.*,
89, 183 (1967) .

68) J. C. Sheehan, D. D. H. Yung : *J. Am. Chem. Soc.*, 80, 1154
(1958) .

69) 宮本益雄, 川松豊, 篠原正和, 上農義雄 : *薬誌*, 81, 439 (1961) .

70) P. Lefrancier, E. Bricas : *Bull. Soc. Chim. France*, (1965)
3668.

71) H. Hartmann, J. Heidberg : *Z. Naturforschg.*, 19b, 1095

- (1964).
- 72) H. Yajima, K. Kawasaki, Y. Okada, H. Minami, K. Kubo, I. Yamashita: Chem. Pharm. Bull., 16, 919 (1968).
- 73) J. S. Fruton: "Advances in Protein Chemistry" Vol. 5, Academic Press Inc., New York (1949) P1.
- 74) St. Guttman, R. A. Boissonnas: Experientia, 17, 265 (1961).
- 75) D. T. Gish, F. H. Carpenter: J. Am. Chem. Soc., 75, 5872 (1953).
- 76) M. Bergmann, L. Zervas, H. Rinke: Z. Physiol. Chem., 224, 40 (1934).
- 77) K. Hofmann, A. Rheiner, W. D. Peckham: J. Am. Chem. Soc., 75, 6083 (1953).
- 78) M. E. Clubb, P. M. Scopes, G. T. Young: Chimia, 14, 363 (1960).
- 79) P. M. Scopes, K. B. Walshaw, M. Welford, G. T. Young: J. Chem. Soc., (1965) 782.
- 80) C. Gros, M. P. deGarihe, A. Costopanagiotis, R. Schwyzer: Helv. Chim. Acta, 44, 2042 (1961).
- 81) Y. T. Kung *et al.*: Scientia Sinica (China), 15, 544 (1966).
- 82) R. Schwyzer: The 17th Intern. Congr. Pure Appl. Chem., Munich, Vol. II, P180 (1960).
- 83) G. L. Trites, D. W. Woolley: J. Am. Chem. Soc., 82, 2787 (1960).
- 84) T. Hayakawa, Y. Fujiwara, J. Noguchi: Bull. Chem. Soc. Japan, 40, 1205 (1967).
- 85) K. Hofmann, F. M. Finn, M. Limetti, J. Montibeller, G. Zanetti: J. Am. Chem. Soc., 88, 3633 (1966).
- 86) G. Losse, H. Jeschkeit, W. Langenbeck: Ber., 96, 204 (1963).

- 87) E. Wünsch, A. Fontana, F. Drees : Z. Naturforschg., 22b,
607 (1967) .
- 88) K. Hofmann, W. Haas, M. J. Smithers, G. Zanetti : J. Am. Chem. Soc., 87, 631 (1965) .
- 89) K. Hofmann, W. Haas, M. J. Smithers, R. D. Wells, Y. Wolman, N. Yanaihara, G. Zanetti : J. Am. Chem. Soc., 87, 620 (1965) .
- 90) M. Bergmann, L. Zervas, H. Rinke : Z. Physiol. Chem., 224,
40 (1934) .
- 91) M. Bodanszky, J. T. Sheehan : Chem. & Ind., (1960), 1268.
- 92) R. Paul, G. W. Anderson, F. M. Callahan : J. Org. Chem., 26,
3347 (1961) .
- 93) M. Bodanszky, M. A. Ondetti : Chem. & Ind., (1966), 26.
- 94) J. Kovacs, M. Q. Ceprini : Chem. & Ind., (1965), 2100.
- 95) M. Bodanszky, N. J. Williams : J. Am. Chem. Soc., 89, 685
(1967) .
- 96) N. F. Albertson : "Organic Reaction", Vol. XII, P157
(1962) .
- 97) F. H. C. Stewart : Aust. J. Chem., 18, 887 (1965) .
- 98) F. Sanger : Biochem. J., 39, 507 (1945) .
- 99) A. B. Lerner, T. H. Lee : Vitamins and Hormones, 20, 337
(1963) .
- 100) K. Hofmann, H. Yajima : J. Am. Chem. Soc., 83, 2289 (1961) .
- 101) S. Moore, D. H. Spackman, W. H. Stein : Anal. Chem., 30,
1185 (1958) .
- 102) S. M. Partridge : Biochem. J., 42, 238 (1948) .
- 103) J. F. Roland, A. M. Gross : Anal. Chem., 26, 502 (1954) .
- 104) J. P. Greenstein, J. B. Gilbert, P. J. Fodor : J. Biol. Chem.,
182, 451 (1950) .

本研究の内容は下記に公表した。

H. Yajima, Y. Okada, Y. Kinomura, E. Seto : Chem. Pharm. Bull.,
15, 270 (1967) .

H. Yajima, Y. Okada, T. Oshima, S. Lande : Chem. Pharm. Bull.,
14, 707 (1966) .

H. Yajima, Y. Kinomura, T. Oshima, Y. Okada : Chem. Pharm. Bu-
ll., 15, 1928 (1967) .

矢島治明, 岡田芳男, 木野村保彦, 南英男 : 生化学, 39, 606 (1967) .

H. Yajima, Y. Okada, Y. Kinomura, H. Minami : J. Am. Chem. Soc.,
90, 527 (1968) .